SÉRIE DI
N° D'ORDRE : 43

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE CLERMONT-FERRAND

POUR OBTENIR

LE DIPLOME DE DOCTEUR-INGÉNIEUR

PAR

Guy GAUTRET de La MORICIÈRE
Ingénieur Chimiste E. N. S. C. C.

PREMIÈRE THÈSE

La Décarboxylation de la Lysine

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 28 Juin 1968, devant la Commission d'examen

Président : M. R. RAMBAUD
Membres du Jury :
M. A. DUPLESSIS-KERGOMARD
M. G. CHATELUS
M. J. BERGER

SÉRIE DI
N° D'ORDRE : 43

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE CLERMONT-FERRAND

POUR OBTENIR

LE DIPLOME DE DOCTEUR-INGÉNIEUR

PAR

Guy GAUTRET de La MORICIÈRE
Ingénieur Chimiste E. N. S. C. C.

PREMIÈRE THÈSE

La Décarboxylation de la Lysine

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 28 Juin 1968, devant la Commission d'examen

Président : M. R. RAMBAUD

Membres du Jury :

M. A. DUPLESSIS-KERGOMARD
M. G. CHATELUS
M. J. BERGER

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

PERSONNEL FACULTE DES SCIENCES ANNEE SCOLAIRE 1967-1968

Doyen : M. SAUREL Jean

1er Assesseur : M. KOLHMULLER Robert

2ème Assesseur : M. RAOULT Gaston

PROFESSEURS

M. RAMBAUD René	Chimie	T
M. BLANC Eugène	Mécanique Rationnelle	T
M. ROQUES Maurice	Géologie	T
M. LAPADU-HARGUES Pierre	Minéralogie	T
M. LUTZ Hubert	Biologie Animale	T
M. RAOULT Gaston	Physique	T
M. CHAMPAGNAT Paul	Physiologie Végétale	T
M. DUPLESSIS-KERGOMARD Alain	Chimie	TP
M. AVAN Louis	Physique Expérimentale	T
Mme HENNEQUIN Françoise	Mathématiques	T
Mle BERTHET Ginette	Physique	TP
M. LOISEAU Jean	Botanique	T
M. COMBE René	Physique	TP
M. de PUYTORAC Pierre	Zoologie	T
Mme AVAN Madeleine	Physique	TP
Mle DONDON Marie-Louise	Chimie Physique	TP
M. DELOST Paul	Physiologie Animale	TP
M. SAUREL Jean	Physique	TP
M. VIALLARD André	Chimie	TP
M. KOHLMULLER Robert	Chimie Minérale	T
M. GUILLAUME Marcel	Algèbre	T
M. COMBE Jean	Physique Générale	T
M. HENNEQUIN Paul-Louis	Mathématiques Appliquées	T
M. L'HERITIER	Génétique	T

PERSONNEL FACULTE DES SCIENCES MONTPELLIER 1987-1988

Doyen : M. SIBEL Jean

1er Assesseur : M. KOLAKOWSKI Robert

2ème Assesseur : M. RAOULT Gaston

PROFESSEURS

M. BAYSSADO René	Chimie	T
M. BLAVO Eugène	Mécanique Rationnelle	T
M. ROQUES Maurice	Géologie	T
M. GAYRAUD-MARQUES Pierre	Minéralogie	T
M. LUTZ Hubert	Biologie Animale	T
M. RAOULT Gaston	Physique	T
M. BRAMBAUDT Paul	Physiologie Végétale	T
M. DURGEOTTE-FERRONNIERE Alain	Chimie	TP
M. AVAN Nouzé	Physiologie Expérimentale	T
Mme HERMESDIN Françoise	Thermodynamique	T
Mlle DEFRANET Ginette	Physique	TP
M. LUSSEAU Jean	Mécanique	T
M. COMBE Pierre	Physique	TP
M. de PAYTONNO Pierre	Zoologie	T
Mme AVAN Nadjiatou	Physique	TP
Mlle DONDON Marie-Louise	Chimie Physique	TP
M. DELUSET Paul	Physiologie Animale	TP
M. SAUVEL Jean	Physique	TP
M. VIDAL-ARD André	Chimie	TP
M. KOHLMULLER Robert	Chimie Minérale	T
M. DUTILLAUX Marcel	Algèbre	T
M. COMBE Jean	Géométrie	T
M. HERMESDIN Paul-Louis	Mécanique Appliquée	T
M. LAFFITTE	Géologie	T

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M.	PETERLONGO Jean-Marc	Géologie
M.	BAILLAUD Lucien	Botanique
M.	VESSIERE Roger	Chimie
M.	BATHIER Marcel	Physique
Mle	DUCHER Suzanne	Chimie
M.	FALGAS Maurice	Mathématiques
M.	ROCHE Jean-Etienne	Physique
M.	MARTINET Pierre	Chimie
M.	MAISONNEUVE Jacques	Géologie
M.	CAPESTAN Michel	Chimie
M.	LENOIR Marcel	Mathématiques
M.	THOMAS Jean	Physique
M.	BERNARD Maurice	Physique

MAITRES DE CONFERENCES

M.	GRAIN Jean	Zoologie
M.	ISABELLE Didier	Physique
M.	CAUBERE Paul	Chimie
M.	SOULAGE René	Géophysique Générale
M.	DUFAURE Jean-Paul	Biologie Animale
M.	COURDUROUX Jean-Claude	Zoologie
M.	ARIBAUD François	Mathématiques
M.	JEAN Claude	Physiologie Animale

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M.	CHADEYRAS Marcel	Mathématiques
M.	BADRIKIAN Albert	Mathématiques
Mme	BESSERRE Anne-Marie	Mathématiques
M.	BOILLAT Guy	Mathématiques
M.	LE THANH Phong	Mathématiques

ATTACHEE PRINCIPALE

Mme CHOPART Marie-Louise

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M.	PETERLONGO Jean-Marc	Géologie
M.	BAILLAUD Lucien	Botanique
M.	VESSIERE Roger	Chimie
M.	BATHIER Marcel	Physique
Mlle	DUCHER Suzanne	Chimie
M.	FALGAS Maurice	Mathématiques
M.	ROCHE Jean-Etienne	Physique
M.	MARTINET Pierre	Chimie
M.	MAISONNEUVE Jacques	Géologie
M.	CAPESTAN Michel	Chimie
M.	LENOIR Marcel	Mathématiques
M.	THOMAS Jean	Physique
M.	BERNARD Maurice	Physique

MAITRES DE CONFERENCES

M.	GRAIN Jean	Zoologie
M.	ISABELLE Didier	Physique
M.	CAUBERE Paul	Chimie
M.	SOULAGE Rémi	Géophysique Générale
M.	DUFAURE Jean-Paul	Biologie Animale
M.	COURCOUROUX Jean-Claude	Zoologie
M.	ARIBAUD François	Mathématiques
M.	JEAN Claude	Physiologie Animale

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M.	CHADEYRAS Marcel	Mathématiques
M.	BADRIKIAN Albert	Mathématiques
Mme	BESSERRE Anne-Marie	Mathématiques
M.	BOILLAT Guy	Mathématiques
M.	LE THANH Phong	Mathématiques

ATTACHEE PRINCIPALE

Mme CHOPART Marie-Louise

A ma femme,

et à ceux à qui je dois beaucoup,

mes parents,
mes beaux-parents,
et tous mes amis.

Au terme de mes études, je tiens à exprimer simplement mon estime et ma reconnaissance à Monsieur CHATELUS qui m'a permis de faire de ces trois ans de recherches une étape particulièrement riche dans l'apprentissage de ma vie professionnelle.

Je lui dois l'estime parce qu'il a su me guider et m'écouter à tout instant, par delà les nombreuses difficultés extérieures à nos recherches.

Je lui suis reconnaissant d'avoir comblé le fossé entre le "patron" et l'élève au point de donner à nos relations professionnelles un ton toujours amical.

Souhaitons que cet esprit d'équipe se perpétue parmi nos camarades afin qu'une mutuelle compréhension redonne au monde de la recherche un visage plus humain.

Mes remerciements s'adressent à Monsieur le Professeur RAMBAUD qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury et m'a aimablement accueilli à l'ENSCC, ainqi qu'à Monsieur le Professeur DUPLESSIS-KERGOMARD qui a bien voulu examiner le travail et me conseiller.

Monsieur le Professeur BERGER, de la Faculté de Médecine et de Pharmacie m'a proposé le second sujet et a bien voulu également faire partie du jury, ce dont je le remercie vivement.

" L'hypothèse scientifique n'est jamais vraie,

elle ne peut être qu'utile "

H. Poincaré.

P L A N

INTRODUCTION . . . . . P. 1

THEORIE GENERALE DE LA DECARBOXYLATION

I Cas général . . . . . P. 2

II Cas des acides aminés. . . . . P. 5

III Décarboxylation enzymatique . . . . . P. 13

IV Décarboxylation de la lysine . . . . . P. 16

V Conclusion . . . . . P. 22

DECARBOXYLATION DE LA LYSINE EN PRESENCE DE BENZALDEHYDE

I Introduction . . . . . P. 23

II Formation d'une base de Schiff entre lysine et benzaldéhyde . P. 24

III Choix du solvant. . . . . P. 26

IV Influence du rapport benzaldéhyde lysine. . . P. 28

V Décarboxylation de l'ε benzylidène-lysine . . P. 29

VI Décarboxylation de l'ε benzylidène-lysine en présence . . P. 33

VII Résumé des résultats . . . . . P. 36

ETUDE COMPARATIVE DE LA DECARBOXYLATION DE LA LYSINE AVEC DIVERS ALDEHYDES ET CETONES

I Introduction . . . . . P. 37

II Essais avec l'anisaldéhyde . . . . . P. 38

III Essais avec le salicylaldéhyde . . . . . P. 39

IV Essais avec le p-nitro-benzaldéhyde . . . . . P. 40

V Essais avec l'acétophénone . . . . . P. 41

VI Conclusion . . . . . P. 42

VII Essai de préparation de la cadavérine . . . . P. 43

PARTIE EXPERIMENTALE . . . . . P. 44

CONCLUSION . . . . . P. 59

INTRODUCTION

Cette étude se situe dans le cadre d'un projet du professeur FROMAGEOT, projet visant à valoriser les acides aminés obtenus par hydrolyse de substances d'origine biologique.

En effet, les acides aminés peuvent donner naissance, par décarboxylation, à des amines susceptibles de constituer des intermédiaires de synthèse. A la suite de la brutale disparition du professeur FROMAGEOT en 1958, Monsieur CHATELUS décida de poursuivre ce travail.

C'est ainsi qu'après avoir étudié la décarboxylation des acides aminés dans leur ensemble, il me confia le problème de la lysine. Celui-ci avait été peu étudié par les auteurs intéressés par les décarboxylations, sans doute à cause du comportement particulier de la lysine.

La décarboxylation de la lysine présente cependant un certain intérêt pratique du fait qu'elle doit permettre d'accéder en une simple opération à une diamine de synthèse relativement coûteuse. Il serait ainsi possible de relier directement une source naturelle à la synthèse organique.

Le but de ce travail est donc d'analyser plus précisément le comportement de la lysine dans sa décarboxylation pour pouvoir établir les règles qui dicteront le choix des conditions d'accès à la cadavérine, son produit normal de décarboxylation.

THEORIE GENERALE DE LA DECARBOXYLATION

I - Cas général

La décarboxylation peut être considérée comme la substitution du groupe carboxylique d'un acide par un atome d'hydrogène :

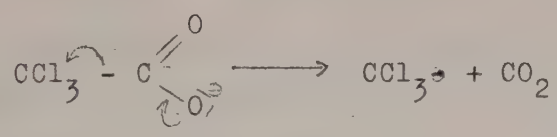
$$R - CO_2H \longrightarrow R - H + CO_2$$

Les données expérimentales montrent que cette réaction ne s'effectue pas selon un mécanisme unique, mais se ramène à une substitution électrophile soit monomoléculaire soit bimoléculaire.

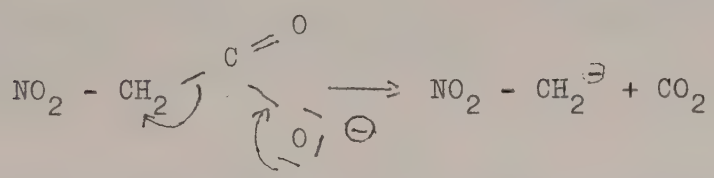
1° Mécanisme monomoléculaire ou S_E1

L'acide peut se décarboxyler soit sous sa forme ionique soit sous sa forme non-dissociée.

Dans le premier cas, la vitesse de décarboxylation est proportionnelle à la concentration en carboxylate. Ce mécanisme est favorisé par la présence d'un substituant attracteur d'électrons sur le carbone en α . Tel est le cas des acides trichloracétique et nitro-acétique, étudiés par BROWN [1].



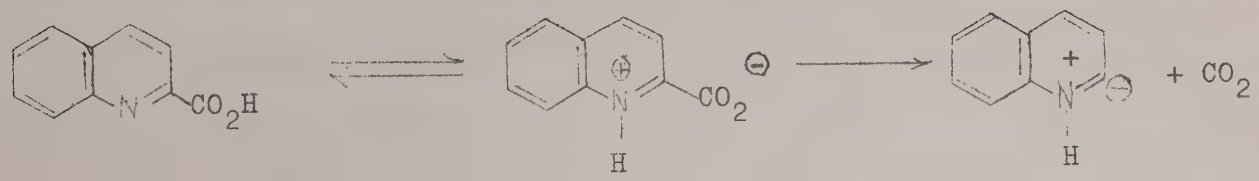
$$CCl_3 - C(=O)O^{\ominus} \longrightarrow CCl_3^{\ominus} + CO_2$$



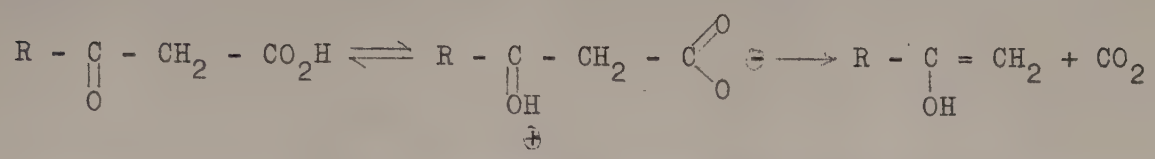
$$NO_2 - CH_2 - C(=O)O^{\ominus} \longrightarrow NO_2 - CH_2^{\ominus} + CO_2$$

Le rôle du substituant attracteur d'électrons est de stabiliser le carbanion formé. C'est surtout PEDERSEN [2] qui a prouvé ce mécanisme, à partir d'études sur l'acide α-nitro-isobutyrique.

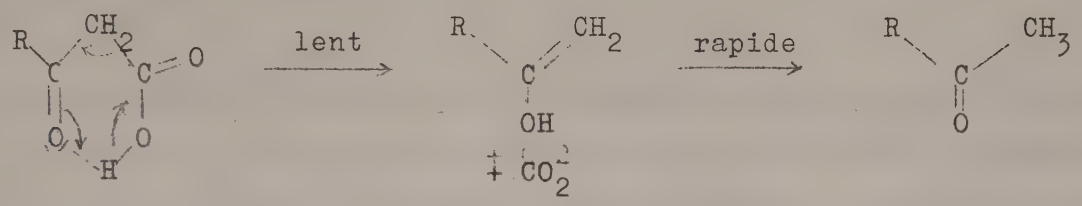
La fixation du proton de l'acide peut ne pas se faire sur le solvant, mais sur l'acide lui-même, si par exemple un atome d'azote entre dans sa structure. Il réagit alors sous une forme zwitterionique.
L'acide quinaldique se comporte ainsi, comme l'ont montré BROWN et HAMMICK [3] :



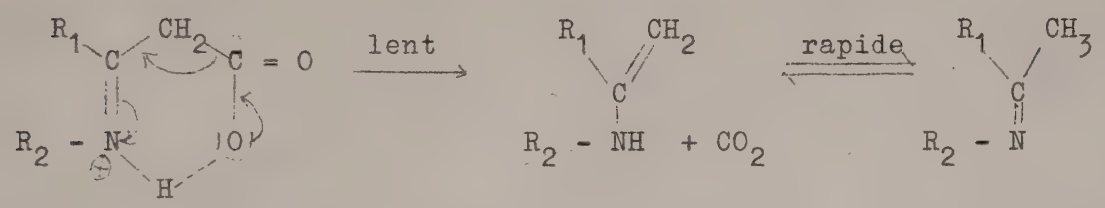
Les acides β-cétoniques se décarboxylent autant sous forme ionisée que sous forme non-dissociée. Pour expliquer le mécanisme de la forme non dissociée, PEDERSEN[2] affirma que cette forme pouvait donner naissance à un zwitterion :



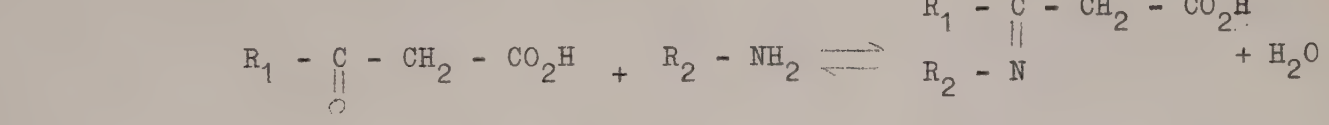
Cette hypothèse fut infirmée par SCHENKEL[4] qui proposa un mécanisme de transfert hexagonal :



Ce mécanisme est à rapprocher de celui des acides β imino-carboxyliques :



Tel est du moins l'explication de la catalyse de la décarboxylation des acides β cétoniques par les amines primaires, observée par PEDERSEN[5]. En effet, l'amine réagit d'abord sur l'acide β cétonique en donnant un acide β imino-carboxylique par condensation :



2° Mécanisme bimoléculaire ou S_E2

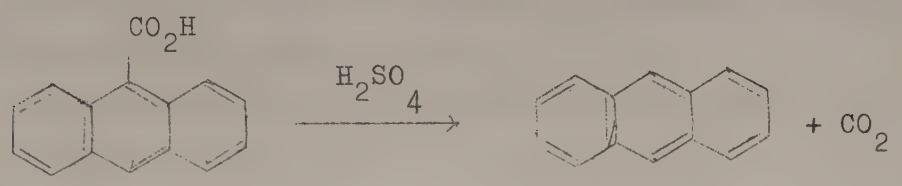
SCHENKEL et SCHENKEL-RUDIN[4] ont pensé que certains acides se décarboxylaient avec une vitesse telle que :

$$v = k \left[H^+\right]\left[R - CO_2H\right]$$

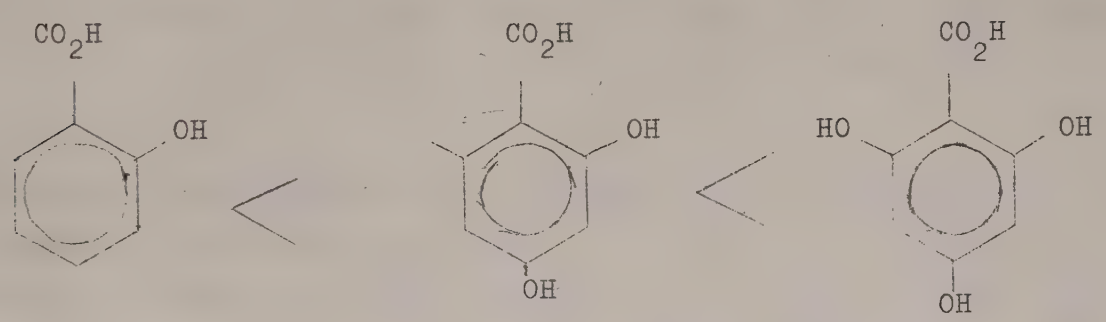
Le mécanisme général étant :

$$H^+ + R - CO_2H \longrightarrow R - H + CO_2 + H^+$$

Ce mécanisme a lieu si le carbone en α de l'acide est très nucléophile. L'équation de vitesse peut se vérifier en jouant sur le pH du milieu. Ainsi les auteurs ont montré que la vitesse de décarboxylation de l'acide anthracène-9-carboxylique était plus rapide en milieu acide fort :



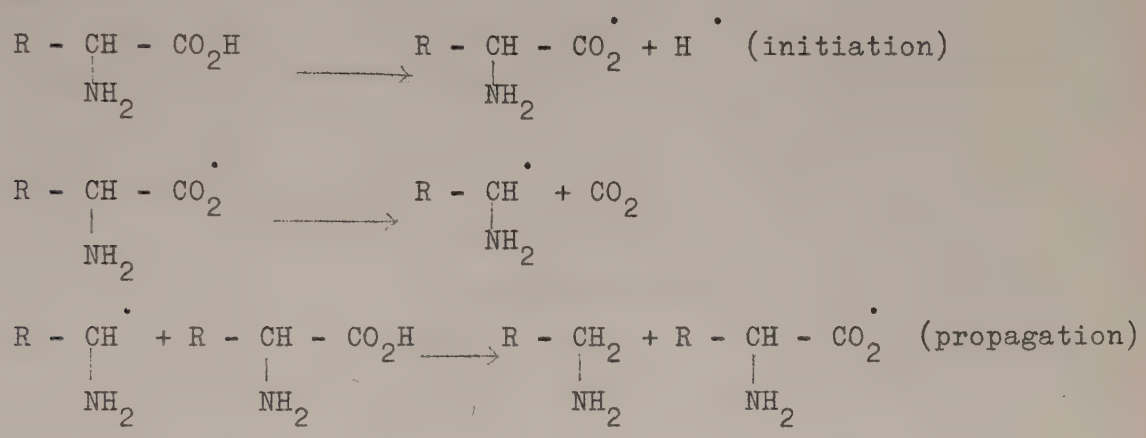
D'autre part BROWN[6] montra que la vitesse de décarboxylation croissait lorsqu'on passait de l'acide ortho-hydroxy-benzoïque à l'acide di-hydroxy 2, 4 benzoïque et à l'acide tri-hydroxy 2, 4, 6 benzoïque, la réaction ayant lieu dans le résorcinol :



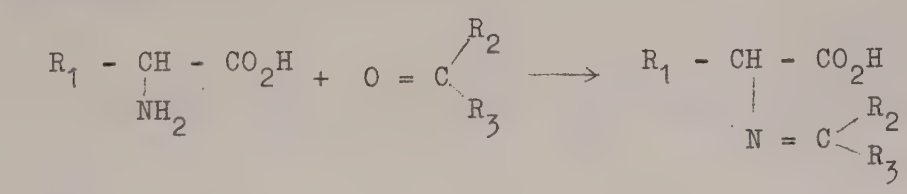
II - Cas des acides α aminés.

Les acides α aminés ne se rattachent à aucun des types d'acides étudiés dans le cas général. On observe effectivement que leur décarboxylation thermique s'accompagne toujours de décomposition, à moins que l'on utilise un catalyseur.

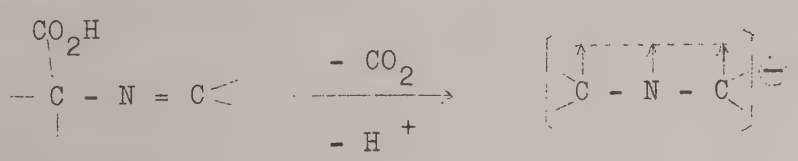
Il existe deux types de catalyseurs prouvant faciliter la décarboxylation thermique des acides aminés.
Le premier est représenté par les peroxydes. Dans ce cas, comme l'a montré KANAO[7], la réaction est homolytique :



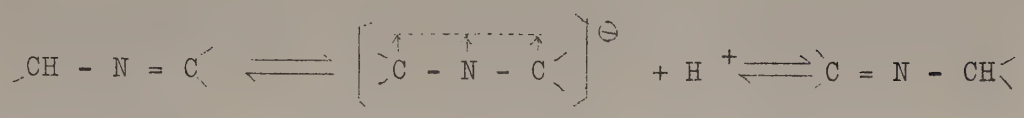
Le second type est représenté par les composés cétoniques. Cette catalyse a été étudiée en particulier par BADDAR[8]. L'auteur a montré qu'en présence de composé carbonylé, la décarboxylation ne se produit pas sur l'acide aminé libre, mais sur la base de SCHIFF issue de la condensation de l'acide avec le composé carbonylé :



BADDAR[8] pensa que la décarboxylation de cet acide α imino-carboxylique était plus facile que celle d'un acide α aminé parce que l'arrachement de CO_2 conduit non pas à un carbanion simple, mais à un carbanion stabilisé par une délocalisation de la double liaison du groupe azométhine :

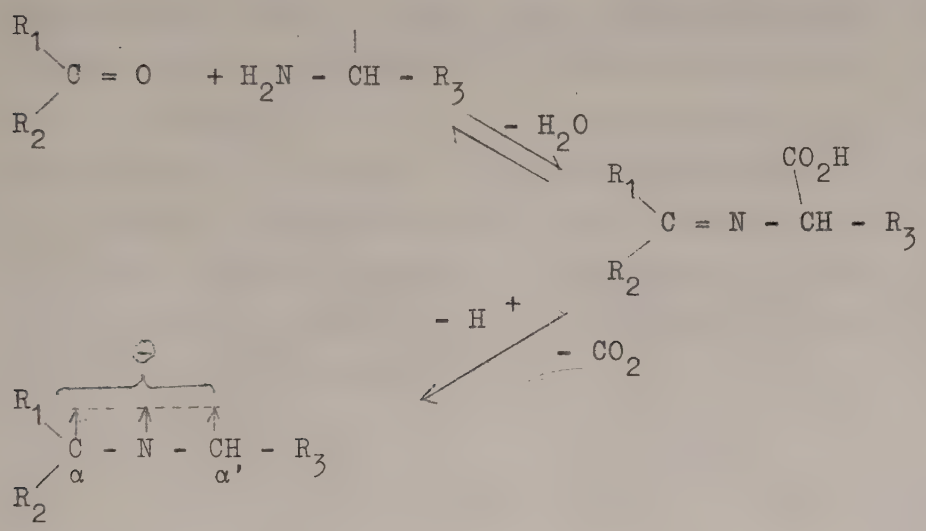


Ce carbanion mésomère est semblable à celui qui, selon INGOLD[9], se forme lors de l'isomérisation prototropique des imines :



A l'appui de cette hypothèse, INGOLD tient compte du fait que cette prototropie n'a lieu qu'en présence de bases fortes.

Partant de ces données, BADDAR[8] a proposé un mécanisme de décarboxylation des acides αaminés en présence de composés carbonylés selon le schéma suivant :



Cet anion mésomère a la possibilité de fixer un proton soit en α , soit en α' , d'où la formation de deux imines :

L'hydrolyse de ces imines donne deux amines :

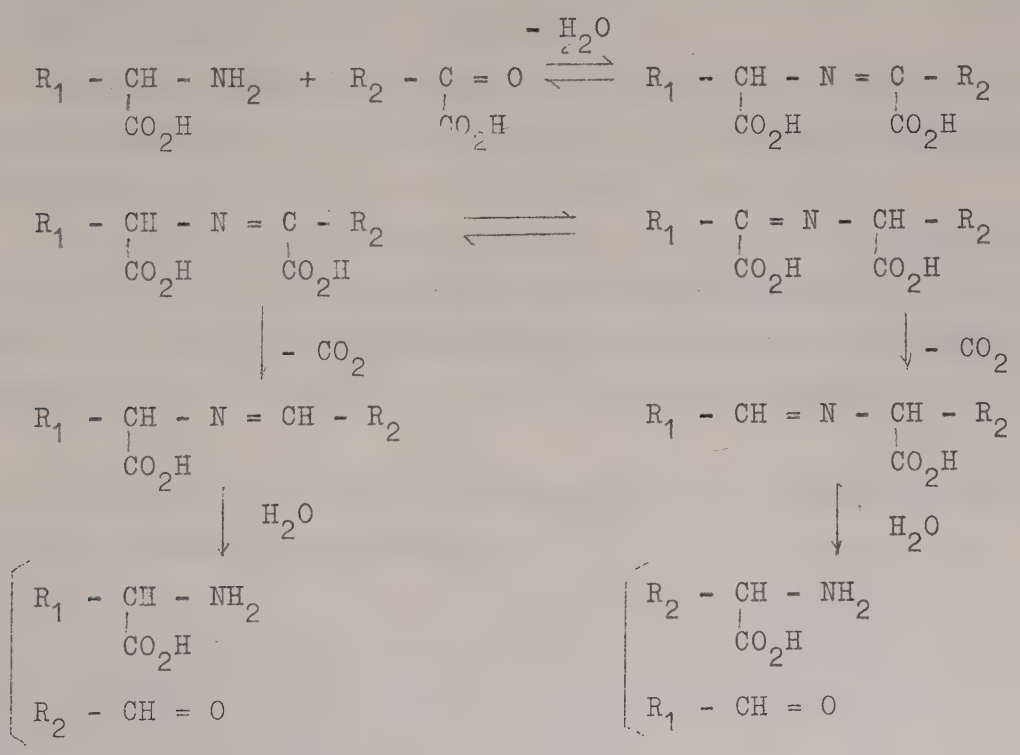
et deux composés carbonylés :

La première amine ($R_3 - CH_2NH_2$) correspond à une décarboxylation normale. La seconde est le produit d'une suite de réactions (condensation, décarboxylation, isomérisation, hydrolyse) que l'on convient d'appeler transamination, à cause de la similitude de ce mécanisme avec les transaminations biochimiques.

BADDAR[8] obtient un mélange des deux amines en opérant la décarboxylation en milieu aqueux et en présence d'une base organique faible, comme la pyridine.

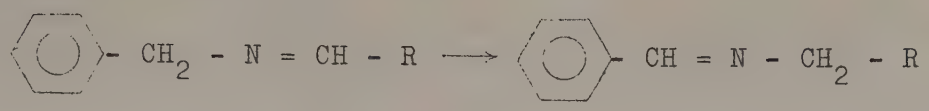
Si cet auteur a proposé la première hypothèse générale sur le mécanisme de la transamination, d'autres auteurs avaient déjà observé la formation d'amines de transamination. Ainsi CURTIUS et LEDERER[10] ont obtenu la benzylamine avec la méthylamine en décarboxylant la glycine en présence de benzaldéhyde. ERLENMEYER[11] obtint des résultats analogues.

HERBST[12] fit une étude intéressante sur la décarboxylation des acides aminés en présence d'acides α-cétoniques. Le processus de catalyse est conforme au schéma de BADDAR. La décarboxylation a lieu sur l'acide aminé ou l'acide cétonique suivant qu'il se produit ou non une isomérisation de l'azométhine, de sorte que la décarboxylation donne toujours naissance à un aldéhyde et un acide aminé :



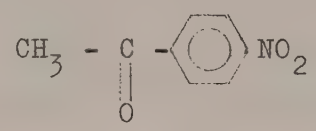
L'isomérisation de l'azométhine peut être favorisée par certains facteurs. Ainsi INGOLD[9] a observé que l'isomérisation est plus facile lorsqu'il y

a conjugaison de l'azométhine formé avec un noyau aromatique :



D'autre part, cette réaction est favorisée par la basicité du milieu et l'élévation de température.

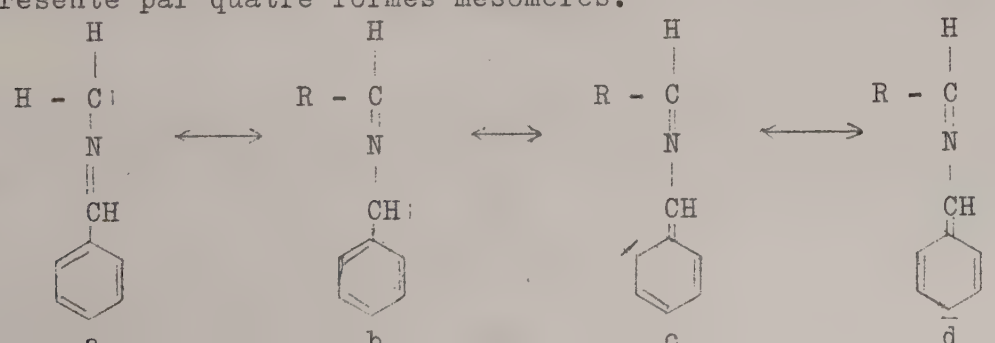
BADDAR[8] a montré que les mêmes facteurs influencent la transamination des acides aminés mais que la décarboxylation est nécessaire pour que l'anion mésomère se forme.
Il utilise des cétones aromatiques et constate que si celles-ci portent un substituant attracteur d'électrons, elles favorisent la transamination. Tel est le cas de la p-nitro-acétophénone :



Il faut cependant tenir compte des facteurs d'empêchement stérique. C'est ainsi qu'une dinitro 4,4' - benzophénone a un effet équivalent à une p-nitro-acétophénone théoriquement moins active. En tous cas, un aldéhyde sera plus réactif que la cétone correspondante.

De manière générale, le taux de transamination dépend de la densité électronique relative sur les deux carbones de l'anion mésomère d'une part, et de la stabilité de la base de SCHIFF formée d'autre part.

Le mécanisme de la transamination a fait par la suite l'objet d'une hypothèse de DOSE[13] qui cherchait à décarboxyler des acides aminés pour obtenir les amines correspondantes. Il utilise le benzaldéhyde et pense également que l'élimination de CO_2 a bien lieu à partir de la base de SCHIFF.
D'après lui, cette élimination donne naissance à un carbanion pouvant être représenté par quatre formes mésomères.



Ces 4 formes donnent une idée de la répartition possible des charges électriques dans le carbanion. L'importance de la transamination observée pourrait s'expliquer par le poids des formes mésomères b, c et d.

DOSE pense que la fixation d'un substituant donneur d'électrons en para sur le noyau benzénique permettra à l'énergie des formes b, c et d d'être supérieure à celle de la forme a. Aussi les formes b, c et d auront-elles un très faible poids.

Cette hypothèse fut vérifiée par l'expérience, car il obtient, au départ de la valine, 65 % de transamination avec le benzaldéhyde, 33 % avec le p-méthoxy-benzaldéhyde et moins de 5 % vac le p-diméthylamino-benzaldéhyde.

Le taux de transamination dépend aussi de la structure de l'acide aminé et particulièrement du degré de substitution du carbone en α :

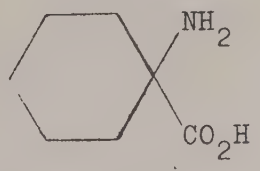
Acide tertiaire en α Acide quaternaire en α

L'étude de ce facteur a été faite par CHATELUS[14], qui utilise des cétones pour catalyser la décarboxylation d'un grand nombre d'acides aminés.

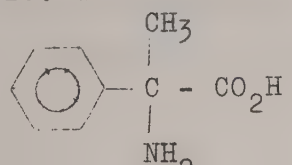
Ses conclusions sont les suivantes : les acides α aminés se divisent en deux catégories selon leur comportement vis-à-vis des cétones.

- Les acides se décarboxylant sans transamination. C'est le cas de tous les acides tertiaires en α, que R_1 soit aliphatique, aromatique ou hétérocyclique.

- Les acides se décarboxylant avec transamination. C'est le cas de presque tous les acides quaternaires en α, y compris ceux pour lesquels ce carbone est inclus dans un cycle saturé, comme l'acide amino 1 cyclohexane carboxylique.:



Les acides quaternaires en α, où R_1 ou R_2 est aromatique ne donnent qu'une transamination partielle. Tel est le cas de l'α-phényl-alanine :



Il faut ajouter à cela que CHATELUS obtient une décarboxylation au départ d'acides N-mono-alcoylés d'une part et un taux de décarboxylation maximum avec les cétones mixtes.

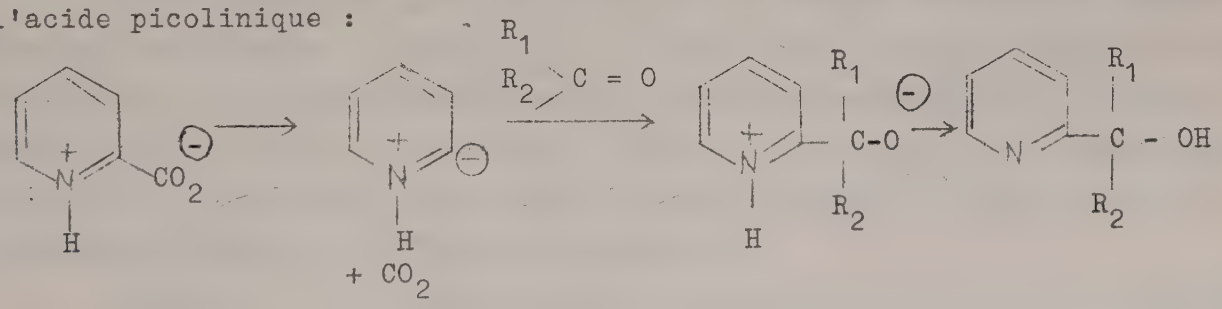
Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux de BADDAR[8] qui affirmait que la transamination avait toujours lieu. CHATELUS pense que cette divergence provient de la différence de milieu utilisé. En effet le premier utilisait la pyridine comme solvant, le second la cétone en excès.

Les travaux de CHATELUS furent repris récemment par AL-SAYYAB et LAWSON[15] qui précisèrent que même les acides à carbone quaternaire en α peuvent fournir, du moins partiellement, l'amine normale. Il suffit que la cétone porte un substituant donneur d'électrons pour annuler l'effet inducteur du radical alcoyle sur le carbone en α et d'empêcher la transamination. Seuls l'acide α amino, αméthyl-butyrique et l'acide α amino-isobutyrique transaminent dans tous les cas.

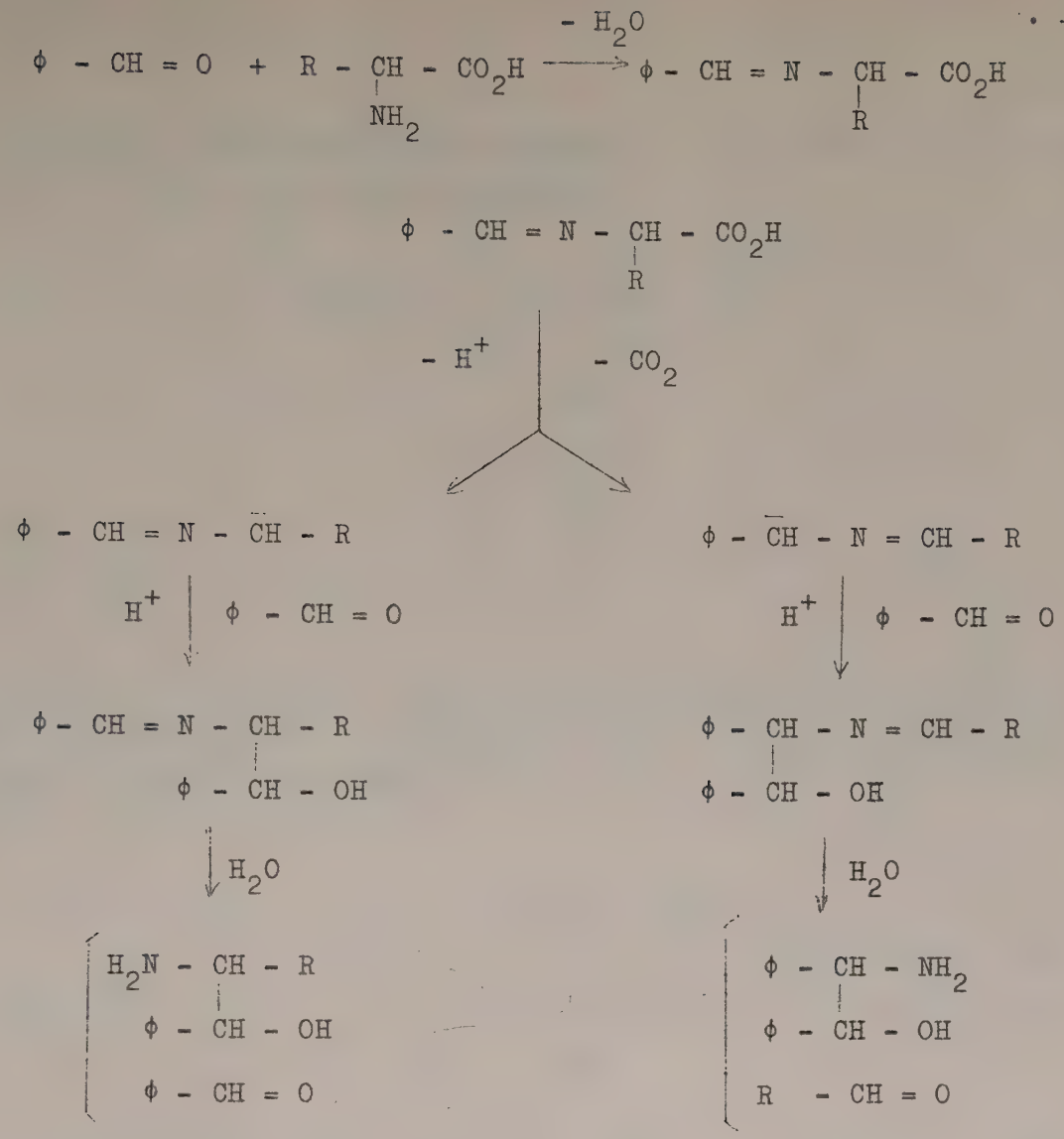
Ces auteurs entreprennent la préparation des bases de SCHIFF des acides aminés. Avant eux, on avait seulement formé ces bases avec le pyridoxal. On a aussi réalisé la condensation avec le benzaldéhyde et le salicylaldéhyde mais seulement au départ d'un sel de l'acide aminé[16].

De même, AL-SAYYAB et LAWSON n'ont obtenu que les bases formées avec des cétones aromatiques ortho-hydroxylées et des acides salifiés.

Les composés cétoniques qui catalysent les décarboxylations peuvent, par réaction secondaire, s'additionner au carbanion. Cette hydroxy-alcoylation avait été utilisée par BROWN[1] pour suivre la décarboxylation de l'acide picolinique :



HAMMICK et coll.[17] ont étudié cette réaction dans le cas de la décarboxylation d'acides aminés en présence de benzaldéhyde.
Ils ont observé qu'il se produisait deux hydroxy-alcoylations donnant deux amines β hydroxylées. Ils proposèrent alors le mécanisme suivant :



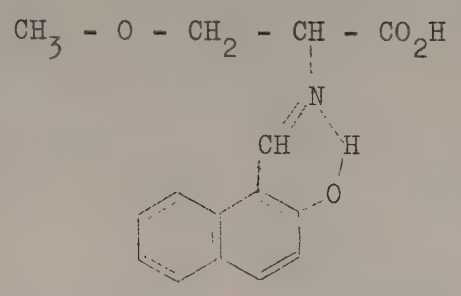
Cette formation d'amine β hydroxylée, ou éthanol-amine, a été aussi observée par AKABORI[18] à partir de l'alanine et du benzaldéhyde.

Cette hydroxy-alcoylation présente un certain intérêt en synthèse organique. Ainsi EMOTO et ANDO[19] ont utilisé cette réaction entre l'O-méthyl-sérine et le p-nitro-benzaldéhyde comme étape dans la synthèse du chloramphénicol. Ils ont, pour cela, étudié l'influence du solvant, et observé que les solvants à constante diélectrique élevée favorisent la décarboxylation et les solvants basiques l'hydroxy-alcoylation.

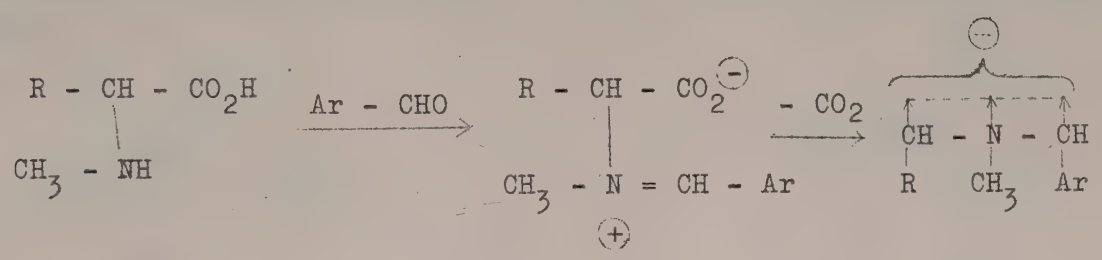
Selon eux, le diméthyl-sulfoxyde présente les meilleures propriétés pour le but poursuivi.
Sans pouvoir l'expliquer, ils ont reconnu que le p-cymène était un bon solvant de décarboxylation.

Pensant également que la décarboxylation ne pouvait se faire qu'au départ de la base de SCHIFF, ils ont essayé d'isoler cette base formée entre l'O-méthyl-sérine et quelques aldéhydes. Une seule est isolable et purifiable,

celle formée par l'hydroxy-2-naphtaldéhyde -1. Ils pensent que la stabilité de la base est due à une liaison hydrogène :



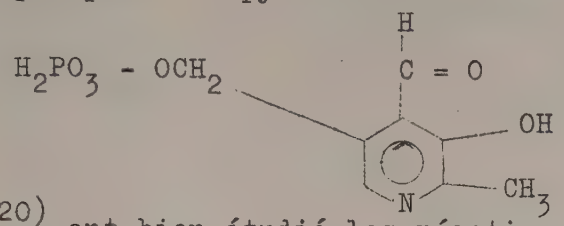
Ayant réussi, d'autre part, à décarboxyler un N-méthylamino acide avec un aldéhyde, ils ont proposé un mécanisme faisant intervenir une forme zwitterionique de la base de SCHIFF :



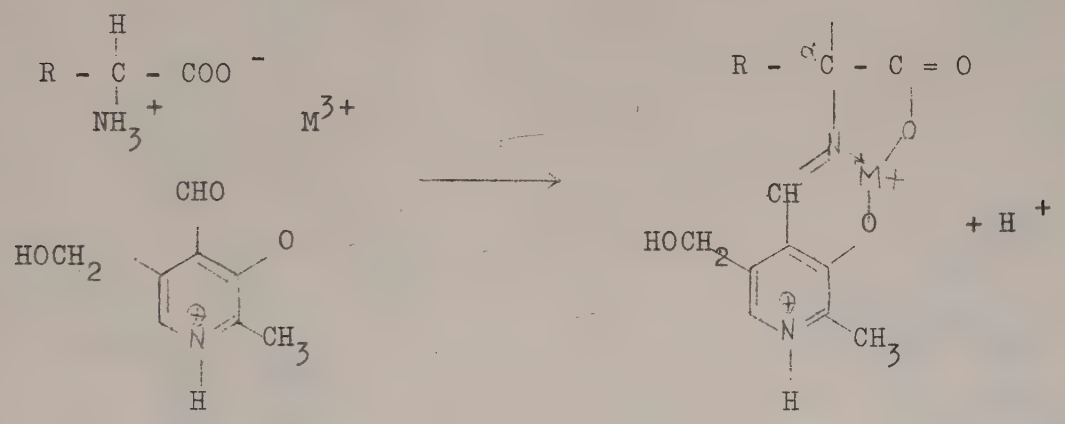
La réaction se poursuit comme dans le cas des acides aminés normaux.

III - Décarboxylation enzymatique

La décarboxylation des acides α aminés représente une phase importante de leur métabolisme. Elle est réalisée par la vitamine B_6 dont le "co-enzyme" est le phosphate de pyridoxal :



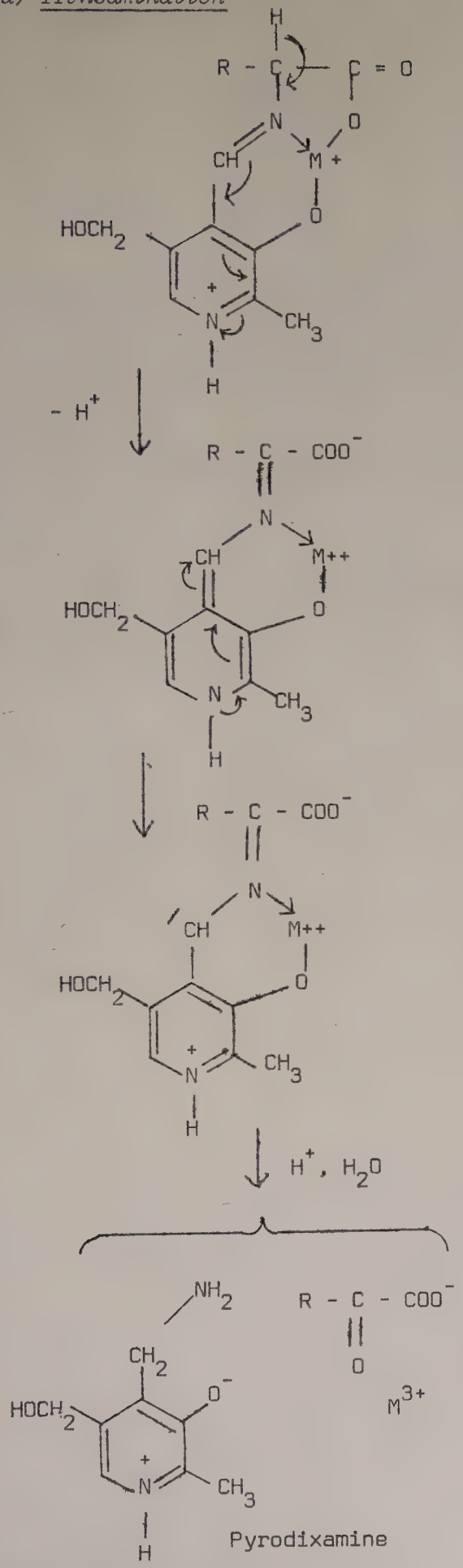
METZLER et coll. [20] ont bien étudié les réactions biochimiques dûes à cette enzyme et ont réalisé "in vitro", en présence de pyridoxal et de sels de métaux lourds des modèles de réactions enzymatiques. Dans ces conditions, le pyridoxal est capable de produire des racémisations, des transaminations et des décarboxylations. Il se condense avec les acides aminés pour former une base de SCHIFF qui fixe alors le métal introduit sous forme d'un chélate interne :



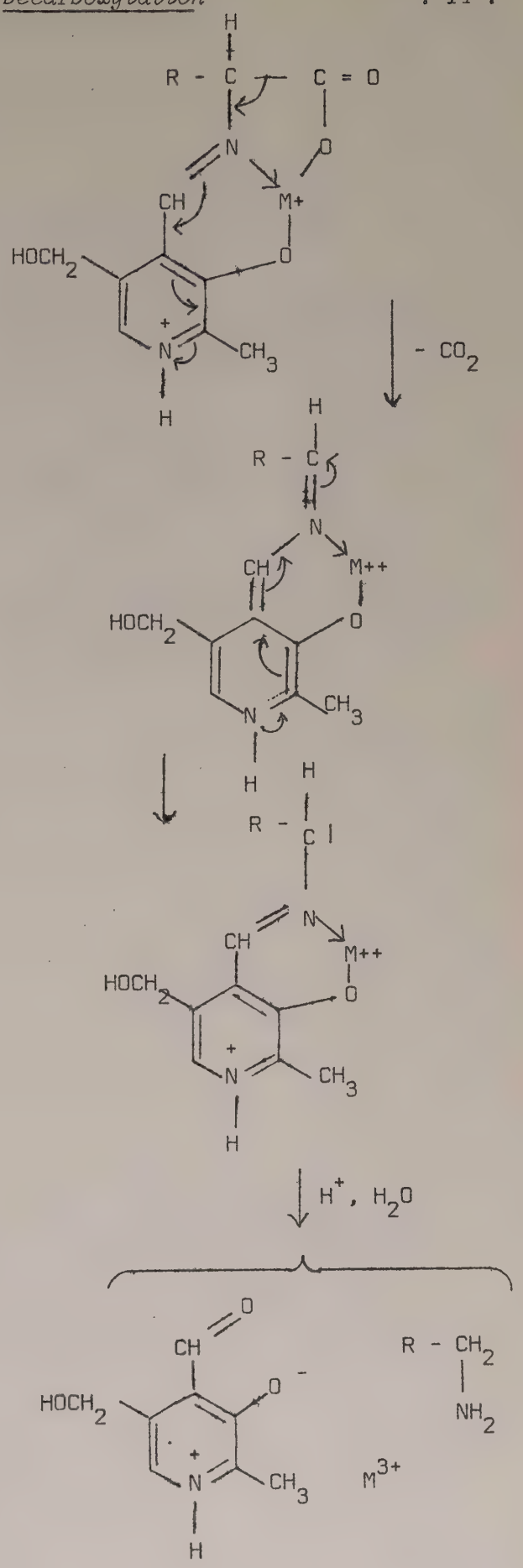
D'après les auteurs, le rôle du cation métallique est de faciliter la formation de la base de SCHIFF et de maintenir la molécule plane. Le noyau pyridinique a un fort effet attracteur d'électrons, analogue à un radical p-nitro-phényle, ce qui tend à libérer le proton du carbone en α . Le métal chélaté agit aussi dans le même sens.

En effet, pour METZLER et coll.[20] les réactions de racémisation, transamination et décarboxylation sont dues à un déplacement d'un des doublets qui lient le carbone en α , soit à l'hydrogène, soit à CO_2. Ce déplacement provoque alors le départ de l'hydrogène ou du CO_2.

a) Transamination



b) Décarboxylation



Notons que la transamination forme toujours un équilibre :

acide aminé + pyridoxal acide cétonique + pyridoxamine

Fait remarquable, transamination et décarboxylation s'excluent mutuellement dans le mécanisme du pyridoxal, mais se suivent dans le métabolisme, lors du passage d'un acide aminé à un aldéhyde :

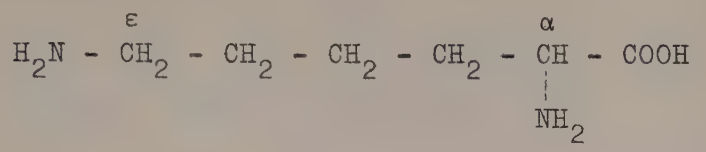
$$\underset{NH_2}{R - CH} - CO_2H \longrightarrow R - CO - CO_2H \xrightarrow{-\ CO_2} R - CH = O$$

Enfin, les enzymes de décarboxylation se distinguent de certaines autres enzymes par le fait qu'elles sont spécifiques de l'individu et non de la famille de composés.

IV - La décarboxylation de la lysine

1° Propriétés de la lysine

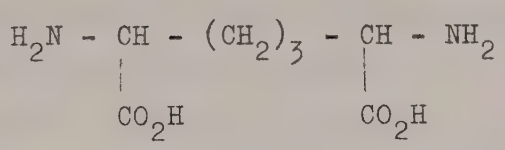
La lysine fait partie des acides α aminés basiques à cause de sa fonction amine en bout de chaine :



C'est donc l'acide diamino-2, 6 hexanoïque ou α, ε diamino caproïque. Elle n'a jamais été isolée à l'état cristallin, il existe pourtant un brevet de préparation de lysine solide à partir du chlorhydrate[23], mais en solution aqueuse, à la concentration maximum de 55 %. Ses sels sont bien cristallisés, le plus courant étant le monochlorhydrate. Celui-ci fut isolé la première fois en 1889 par DRESCHSEL[21], à partir d'un hydrolysat de caséine. On utilise souvent le pricrate pour précipiter la lysine de ses solutions.

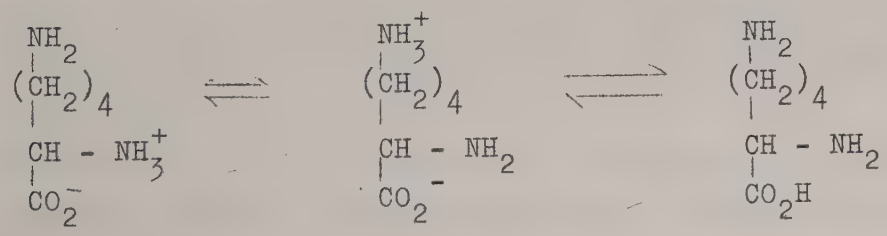
Il existe de nombreuses synthèses de la lysine, au départ de susbstances variées, décrites en particulier par GREENSTEIN et WINITZ[22]. La plus récente semble la plus intéressante, car elle utilise le caprolactame dont la production est en pleine croissance. (Cf. Informations Chimie Mai 1967, n° 48)

On peut aussi accéder à la lysine par voie enzymatique. On part de l'acide α, ε diamino-pimélique :



Une simple décarboxylation de cet aicde au moyen d'une enzyme appropriée fournit la lysine. L'acide diamino-pimélique est lui-même fabriqué, à grande échelle, par une réaction de fermentation[24].

La lysine en solution existe sous trois formes dont deux zwitterioniques :

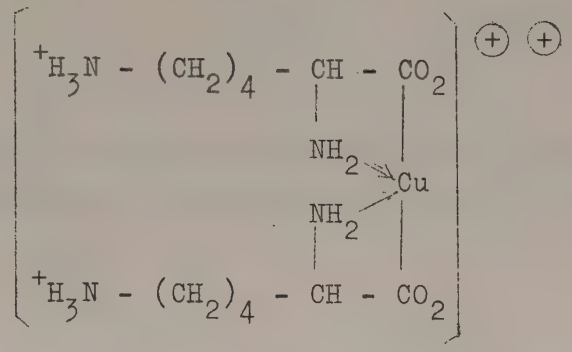


a b c

On a établi qu'elles étaient dans le rapport[25] :

320 000 / 1 800 000 / I

Comme tous les acides aminés, la lysine forme des complexes isolables avec le cuivre[26][27] :



Il semble qu'il existe deux complexes[28] :

. l'un bleu de formule : $(Lys)_2$, $CuCl_2$, 2 H_2O

. l'autre vert : Lys, $CuCl_2$, H_2O

Ce composé présente un grand intérêt, car en bloquant la fonction amine en α , il permet de faire des substitutions sélectives sur la fonction amine en ε.

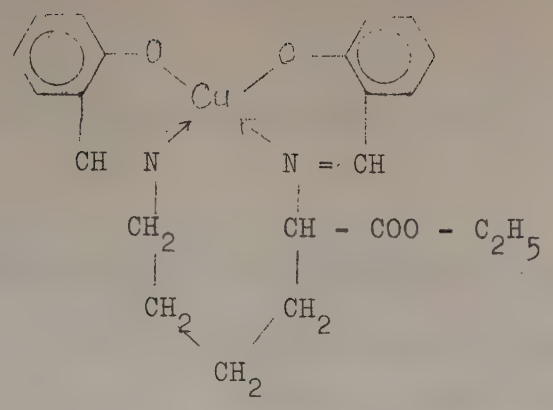
2° Bases de SCHIFF de la lysine

Les premières bases de SCHIFF de la lysine isolées furent obtenues à partir du benzaldéhyde et du salicylaldéhyde, par BERGMANN et ZERVAS[16]. Dans les deux cas, la condensation ne porte que sur une seule fonction amine. La lysine réagit sous forme de son sel de sodium.

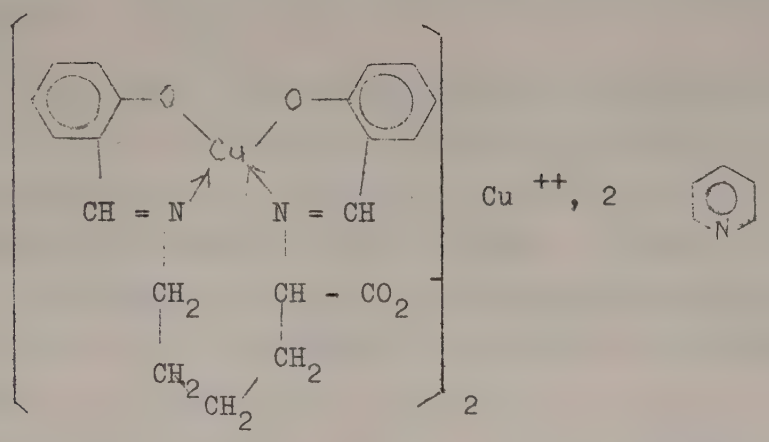
WITKOP et BEILER[29] ont cherché à savoir laquelle des deux fonctions amine se condensait avec le benzaldehyde. Ayant observé que le complexe cuivrique de la lysine se condense aussi bien que la lysine libre, ils en conclurent que la condensation ne se fait que sur la fonction amine en ε . Ils en ont déduit que seule la fonction amine en ε participait aux transaminations biologiques, ce qui fut infirmé par la suite.

Certains auteurs ont pu, cependant, engager les deux fonctions amines de la lysine dans une liaisonnazométhine, mais cela dans des conditions particulières :

PFEIFFER et coll.[30] ont obtenu une double base de SCHIFF en partant de lysinate d'éthyle (monochlorhydrate), complexe salicylaldéhyde-Cu et acétate de sodium :



Avec le chlorhydrate de lysine dans les mêmes conditions, un double complexe se forme, contenant après cristallisation dans la pyridine, deux molécules de pyridine :



3° Conversion de la lysine en cadavérine

La décarboxylation de la lysine doit normalement donner naissance au diamino-1,5 pentane ou cadavérine, ou encore pentaméthylène - diamine :

$$H_2N - (CH_2)_5 - NH_2$$

Cette dégradation est connue depuis longtemps en biologie. Elle fut réalisée plus récemment en chimie non-enzymatique. En effet, il semble que seuls DOSE (1957), CHATELUS (1962) et AL-SAYYAB (1968) aient obtenu la cadavérine par décarboxylation de la lysine par un aldéhyde ou une cétone.

DOSE opère dans le nitro-benzène en présence de p-diméthylamino-benzaldéhyde. Le rendement en cadavérine, évalué en électrophorèse, est de 30 %. CHATELUS décarboxyle le monochlorhydrate de lysine dans l'acéto-phénone en présence de BaO. Il n'obtient que 6 % de cadavérine, isolée sous forme de di-chlorhydrate.

AL-SAYYAB utilise l'o-méthoxy-acétophénone avec la lysine (chlo-rhydrate ?) sans solvant. L'hydrolyse lui fournit 25 % de cadévérine - 2HCl

Aucun auteur ne signale d'amine de transamination à l'issue de la décarboxylation.

4° Décarboxylation enzymatique de la lysine

La lysine peut être décarboxylée par la lysine-décarboxylase. Cette enzyme est spécifique de la lysine au point d'être inactive vis-à-vis de l'ornithine, qui n'en diffère que par un - CH_2-, et de l'ε-acétyl-lysine. GALE[31] a étudié ce type de réaction, et montré que cette décarboxylation enzymatique peut être une indication, à la fois qualitative et quantitative, sur la présence de lysine dans un milieu.

Les enzymes utilisées sont principalement le Bacillus cadaveris. ou l'Escherichia coli 86. Ils présentent un maximum d'activité au pH 6,0.

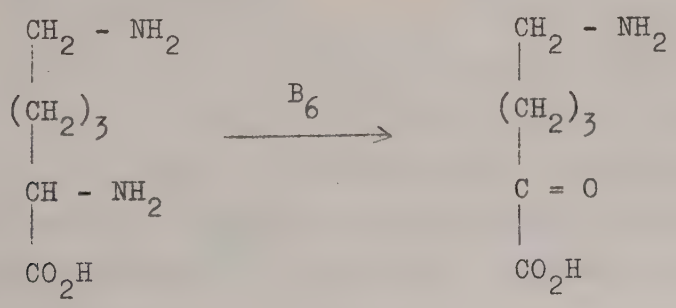
La lysine-décarboxylase est utilisée pour évaluer le pourcentage de lysine dans un milieu biologique, ou pour séparer l'isomère droit - non naturel - à partir du racémique. En effet, la décarboxylase n'agit que sur l'isomère gauche, donnant donc un mélange de D-lysine et cadavérine.

Notons enfin que cette décarboxylation peut avoir lieu dans l'intestin. Ce phénomène pathologique concerne plusieurs acides aminés et donne naissance aux "ptomaïnes" dont la cadavérine fait partie.

5° Métabolisme de la lysine, transamination

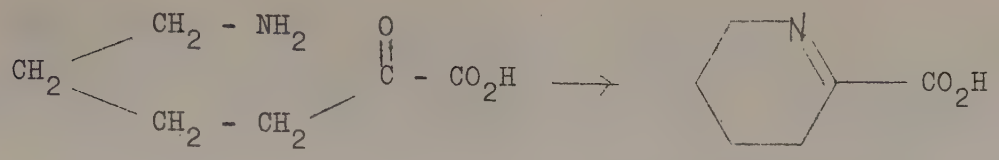
On sait depuis longtemps que la lysine est le précurseur de l'acide α-amino-adipique, mais l'élucidation du mécanisme en est plus récente. C'est ROTHSTEIN et MILLER[32] qui établirent les premiers la succession des différents métabolites.

Il y a d'abord transamination par la vitamine B_6 sur l'azote en α



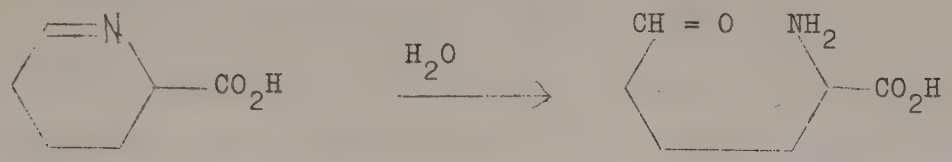
En effet, cette réaction ne se produit pas avec l'ε-acétyl-lysine. Ce résultat est donc en contradiction avec l'hypothèse de WITKOP et BEILER[29].

L'acide cétonique formé se cyclise spontanément :



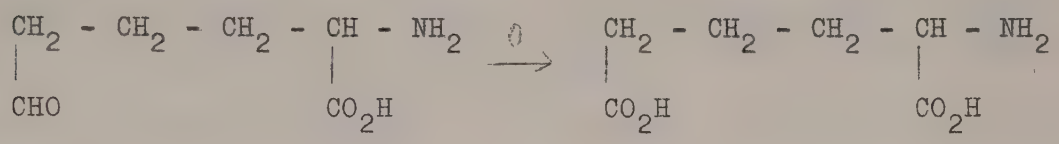
Acide pipéridéine - 2 - carboxylique

Il se produit alors une isomérisation de la double liaison et réouverture du cycle par hydrolyse :



acide αamino-adipique, ε semi-aldéhyde

L'acide formé est ensuite oxydé :



Acide α aminoadipique

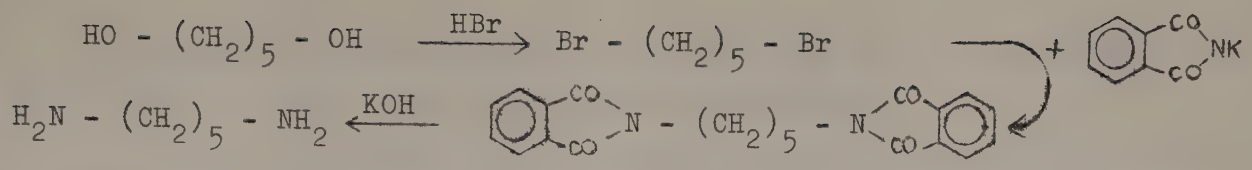
Ainsi, le fait que la transamination soit suivie par une cyclisation explique pourquoi elle n'est pas réversible.

On observe en effet que l'ε-N-acétyl-lysine donne une transamination réversible.

Ce résultat devait être confirmé en même temps par MEISTER[43] qui réalisa une transamination enzymatique "in vitro" de la lysine, et constata qu'elle donnait naissance à l'acide Δ^1 pipéridéine-2-carboxylique.

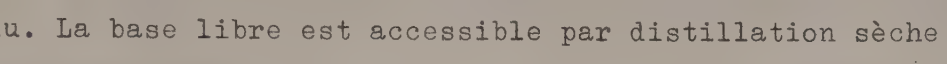
6° La cadavérine

La cadavérine est un liquide sirupeux, fumant, hygroscopique lorsqu'elle est pure. On connait de nombreux sels et dérivés, et un dihydrate solide. En dehors de sa préparation à partir de la lysine, on a signalé que deux modes d'obtention par synthèse. La première préparation a été réalisée par PUTOCHIN[33] au départ du pentane diol 1,5 :



On l'isole sous forme de chlorhydrate recristallisable dans l'alcool absolu. La base libre est accessible par distillation sèche du chlorhydrate sur chaux sodée.

Il existe une méthode plus récente qui consiste à hydrogéner le dinitrile glutarique[34].

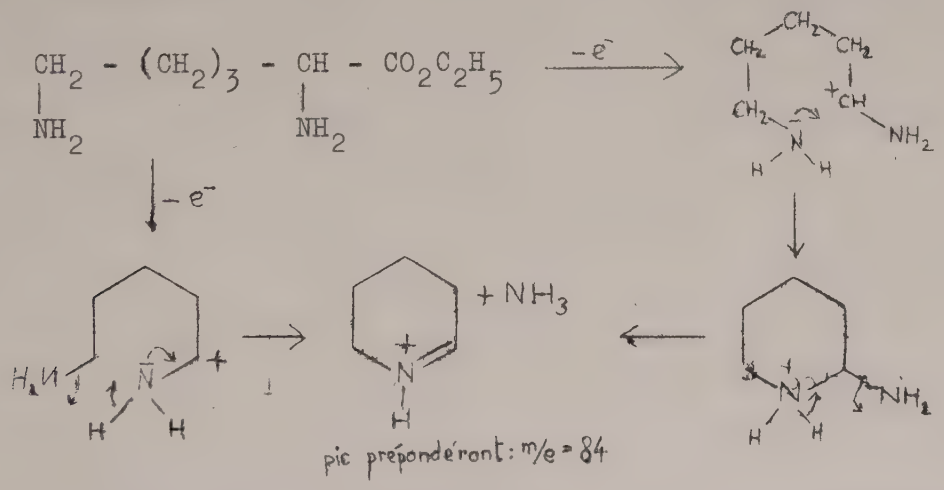


La séparation de la cadavérine d'avec la lysine peut se faire par distillation, par chromatographie sur colonne, ou par précipitation sélective. En effet, les dérivés di-benzoylés et di-(nitrophénylés) de la lysine sont solubles dans l'eau, alors que les mêmes dérivés de la cadavérine y sont insolubles.

Il est aussi possible de précipiter de la cadavérine par formation d'un complexe cuivrique en milieu alcoolique[35].

Par un chauffage convenable, la cadavérine se dégrade en pipéridine et ammoniac :

Ce comportement est à rapprocher du type de fragmentation que donnent les esters de lysine en spectrométrie de masse[36] :



En tant que diamine, la cadavérine peut former des polymères avec les dia i es. On a signalé les polyamides formés avec la cadavérine et l'acide sébacique[37] ou l'acide dipicolinique[38].

V - Conclusion

Il ressort de cette analyse bibliographique que la décarboxylation de la lysine devrait poser deux types de problèmes :

- Le premier est celui des décarboxylations des acides aminés en général, c'est-à-dire l'éventualité d'une transamination.
- Le second, plus complexe, provient de la présence d'une seconde fonction amine dans la molécule de la lysine. En effet, il y a compétition des deux fonctions pour la formation des dérivés et en particulier des bases de SCHIFF. Il y a aussi réaction secondaire comme dans le cas de la transamination enzymatique.

Ces considérations nous ont conduit à faire une étude sur le comportement de la lysine dans les décarboxylations et sur l'influence de la structure du composé carbonylé sur ce comportement . Cette étude, précisons-le, ne vise qu'à déterminer les meilleures conditions pour préparer la cadavérine par décarboxylation de la lysine.

LA DECARBOXYLATION DE LA LYSINE EN PRESENCE DE BENZALDEHYDE

I - Introduction

La recherche des meilleures conditions pour décarboxyler la lysine en cadavérine consiste à étudier l'influence de deux facteurs : le milieu réactionnel et l'agent de décarboxylation. Mais on ne pouvait étudier l'un sans l'autre. Il fallait donc fixer le milieu et faire varier l'agent et réciproquement.

Les travaux antérieurs montrent que le milieu n'a qu'une influence restreinte sur le mécanisme de la décarboxylation. C'est pourquoi nous avons commencé par étudier la décarboxylation de la lysine dans divers milieux, avec un seul agent. Cependant, l'obligation d'utiliser la lysine en solution aqueuse modifiait l'influence du milieu. Nous avons donc pensé à utiliser la lysine sous forme d'un dérivé anhydre. Il était tout indiqué que ce dérivé soit la base de SCHIFF de la lysine formée avec le composé carbonylé utilisé précisément comme agent de décarboxylation.

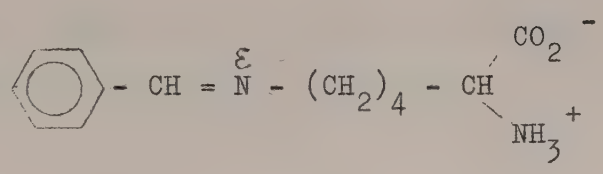
La première étape devait donc concerner le choix de ce composé carbonylé. D'après les travaux antérieurs, notamment ceux de BADDAR, ce sont les aldéhydes aromatiques qui présentent le meilleur effet catalytique sur la décarboxylation. Nous avons donc choisi le benzaldéhyde qui est le plus simple représentant de cette catégorie.

II - Formation de la base de SCHIFF de la lysine avec le benzaldéhyde.

Lorsqu'on met en présence une solution de lysine et une solution alcoolique de benzaldéhyde, on observe la formation spontanée à froid d'un solide blanc. Par dosage d'azote et spectroscopie infra-rouge, on l'identifie à un produit de condensation entre une molécule de lysine et une de benzaldéhyde.
Cette base de SCHIFF est bien celle qu'ont obtenu WITKOP et BEILER[29].

La facilité de condensation est remarquable. Elle pourrait s'expliquer par la basicité du milieu due à la seconde fonction amine. En effet, ZUMAN[39] avait signalé que ce type de condensation est favorisé par la présence d'une base forte.

Cependant un problème devait déjà se poser.
WITKOP et BEILER ont démontré que la condensation du benzaldéhyde se fait avec la fonction ε amine de la lysine :



D'autre part l'effet catalytique de la fonction azométhine n'existe que si cette fonction est portée par le carbone en α . Cette base de SCHIFF ne pourrait logiquement subir une décarboxylation catalytique en tant que t telle. Nous avons voulu le vérifier en chauffant cette base de SCHIFF dans un solvant choisi arbitrairement : le p - cymène. Dans ces conditions on observe une décarboxylation rapide et totale aux environs de 150°, témoignant manifestement d'un effet catalytique. Il y avait une explication à trouver sur le rôle respectif des deux fonctions amines.
Dans ce but, nous avons étudié le comportement de la lysine avec le benzaldéhyde après avoir bloqué tout à tour chaque fonction amine.

Les εN - acétyl-lysine et αN - acétyl-lysine convenaient bien pour ces essais. Ces produits étant coûteux, nous les avons préparés, ce qui présente de nombreuses difficultés. Puis nous les avons traités à chaud en présence de benzaldéhyde dans le p - cymène.

L'ε -acétyl-lysine se décarboxyle facilement. La décarboxylation est accompagnée d'une dissolution, ce qui fait que l' ε-acétyl-lysine en suspension disparaît progressivement et le milieu devient homogène en fin de réaction.

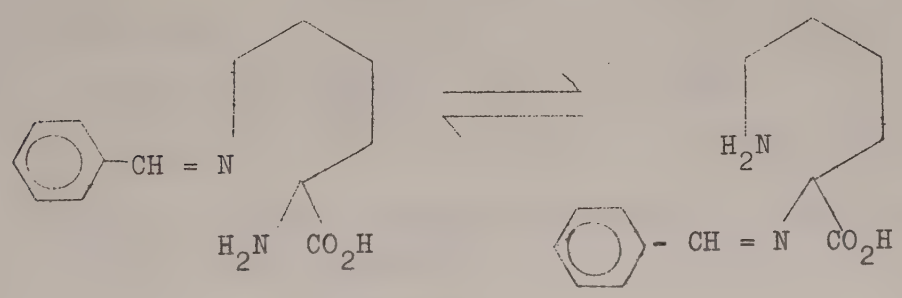
L'α-acétyl-lysine ne donne aucune décarboxylation, même à la température d'ébullition du p-cymène. Le milieu devient cependant homogène ce qui s'explique par la formation d'une base de SCHIFF l'α-acétyl-ε-benzylidène-lysine comme le prouve la présence de la bande - CH = N - (6,08μ) dans le spectre I.R.

Il ressort donc de ces essais que la catalyse ne se produit que si la fonction amine en α est libre, alors que le blocage de la fonction amine en ε ne gène par la réaction.
Il nous faut donc conclure que lorsqu'on chauffe le ε-benzylidène-lysine dans un solvant il y a migration du groupement benzylidène en α, dans une proportion qui est sans doute faible mais suffisante pour catalyser la décarboxylation.

Ce mécanisme est à rattacher aux réactions d'échange entre amines et bases de SCHIFF décrites par SMITH[40] puis par CRIVELLO[41] et coll. :

$$R_1 - NH_2 + R_2 - N = CH - Ar \rightleftharpoons R_1 - N = CH - Ar + R_2 - NH_2$$

Ce qui donnerait dans le cas étudié :



III - Choix du solvant

Nous avons décidé de choisir le solvant en fonction de son influence sur la température et le rendement de la décarboxylation, la réaction étant faite au départ de la benzylidène-lysine.

La température où apparaissent les premières bulles de CO_2, c'est-à-dire le seuil thermique, est choisie comme température de réaction.

Le rendement concerne le rapport CO_2 dégagé par lysine mise en jeu.

Voici donc les résultats obtenus :

Squalane	150°	52 %
p - cymène	130°	88 %
Oxyde de butyle	125°	75 %
Dimethyl-sulfoxyde (DMSO)	160°	92 %
Hexamètapol (HMPT)	130°	89 %
Diacètate de glycol	160°	84 %
Pyridine	110°	95 %
Acide acétique	120°	34 %
Tri-éthylène-glycol (TEG)	160°	100 %

Le rendement restant l'élément déterminant, il nous fallait choisir entre les 5 solvants suivants :

. p - cymène
. DMSO
. HMPT
. Pyridine
. TEG

Le TEG devait se révéler le plus intéressant en raison de certaines qualités que ne présentent pas les autres solvants :

- Inertie chimique, ce qui n'est pas le cas du DMSO et du HMPT
- Très faible volatilité, ce qui n'est pas le cas de la pyridine en particulier.
- Aucune tendance à former des mousses, ce qui n'est pas le cas du p - cymène.

- Assez forte hygroscopie, favorisant donc les condensations avec formation d'eau.

- Aptitude à dissoudre aussi bien la lysine que les aldèhydes et cétones aromatiques.

Malheureusement sa miscibilité à l'eau devait empêcher de l'extraire de la phase aqueuse contenant les chlorhydrates d'amines après hydrolyse du produit de décarboxylation.

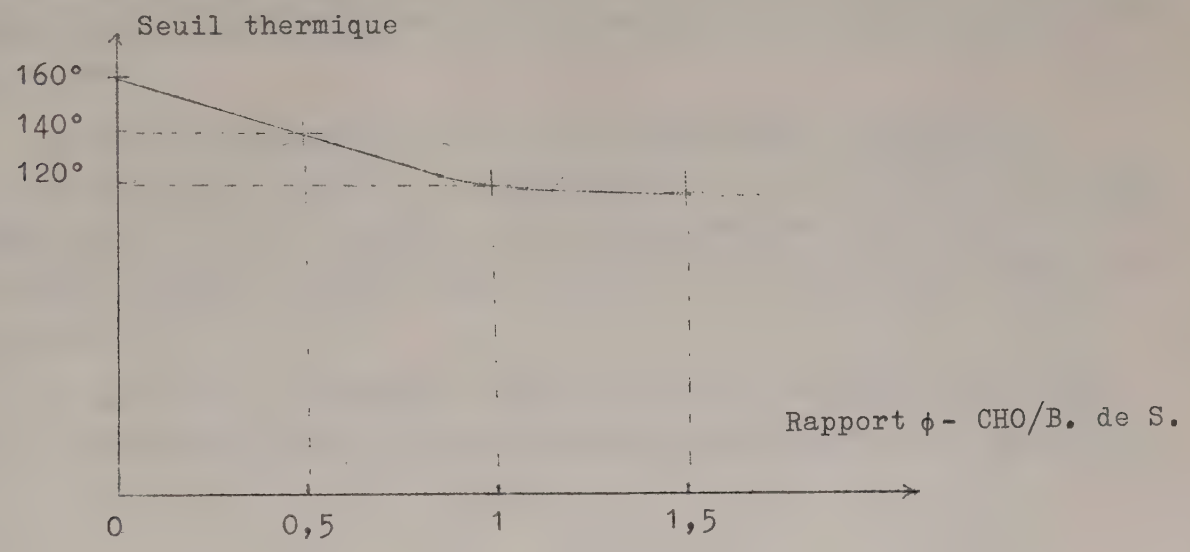
Nous avons donc décidé de l'utiliser pour l'étude qualitative des produits de décarboxylation, les essais d'isolement pouvant être réalisé dans un solvant hydrophobe comme le p - cymène.

IV - Influence du rapport benzaldéhyde / lysine sur la décarboxylation.

Il est donc possible d'effectuer les décarboxylations au départ de la benzylidène-lysine. Ce procédé a l'avantage de permettre d'opérer en l'absence d'eau. L'ε-benzylidène-lysine est insoluble, même à chaud, dans le TEG. La réaction se passe donc en milieu hétérogène. Il n'est pas impossible cependant qu'il existe une très faible solubilité de la base de SCHIFF.

La décarboxylation débute à 160° et se poursuit jusqu'à un rendement en CO_2 de 100 %. On observe qu'à mesure que la réaction progresse, la phase solide disparaît, le milieu devenant homogène. Il faut supposer que les produits formés sont solubles dans le TEG.

Nous avons réalisé une série de décarboxylations en rajoutant des quantités croissantes de benzaldéhyde au mélange initial, ce qui permet de tracer la courbe suivante :



Nous expliquons l'abaissement du seuil thermique par le fait qu'en présence de benzaldéhyde, l'α -benzylidène-lysine, la seule à posséder un effet catalytique, ne se forme plus par migration du groupe ε -benzylidène, mais directement à partir du benzaldéhyde libre, ce qui est plus facile. Ceci est confirmé par le fait qu'il n'y ait plus d'abaissement du seuil thermique au-delà d'une mole de benzaldéhyde par mole de base de SCHIFF.

Cependant, craignant que la réaction ne soit différente suivant la quantité de benzaldéhyde ajoutée, nous avons étudié, du point de vue qualitatif, la réaction mettant en jeu la base de SCHIFF avec et sans benzaldéhyde.

V - La décarboxylation de la ε - benzylidène-lysine

La méthode utilisée est la chromatographie sur couche mince (CCM), la seule qui ne modifie pas le milieu après réaction.
Cependant cette méthode n'est que comparative et les identifications se font par élution simultanée du milieu réactionnel et de substances connues susceptibles d'être présentes dans le milieu. La révélation se fait avec la ninhydrine. Celle-ci ne donne de coloration qu'avec les fonctions amines primaires (du bleu au rouge selon la susbtance) même si l'amine est condensée sous forme azométhine, et les hétérocycles azotés (du jaune à l'orange).

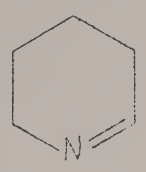
Nous avons ainsi analysé en CCM le produit de décarboxylation de la benzylidène-lysine dans le TEG. Le chromatogramme révélé contient trois taches colorées. On reconnait facilement parmi elles la cadavérine et la benzylamine . La troisième, de couleur jaune, ne correspondait à rien de connu.

Nous avons pu distiller un mélange à partir du milieu réactionnel qui s'avéra posséder la même composition en produits basiques que le milieu. Ce mélange, ayant une volatilité et une stabilité satisfaisantes, a pu être analysé en CPV.

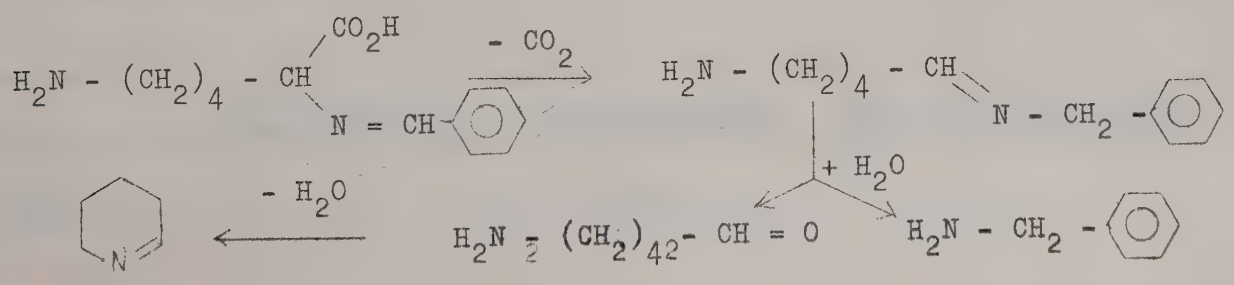
Le chromatogramme contient 4 pics principaux (ci-après)

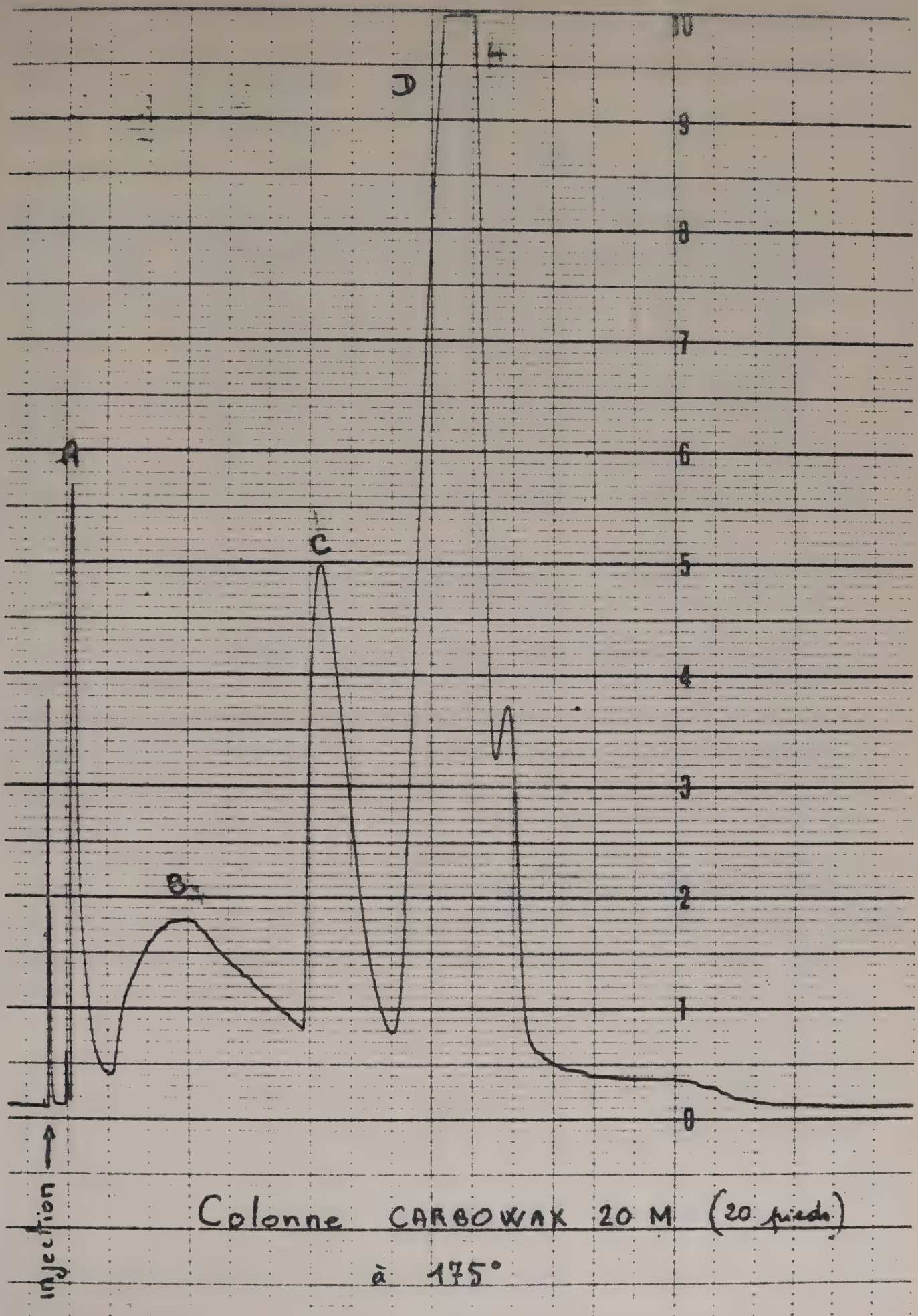
Le pic C est celui de la cadavérine, le pic D celui de la benzylamine. Seul le pic B a pu se prêter à un dosage d'élément qui a donné la formule brute $(C_5H_9N)_n$. D'autre part, les pics A et B donnent la même tache jaune en CCM.

A partir de ces données nous avons émis l'hypothèse que cette substance non reconnue est la Δ^1 pipéridéine ou tétra hydro 2,4 pyridine :



En effet, la présence de benzylamine dans le milieu indique qu'il y a eu transamination partielle de la lysine après décarboxylation. Elle devrait donc donner naissance à l'aldéhyde de structure dérivée de la lysine, soit un ε-amino-pentanal :

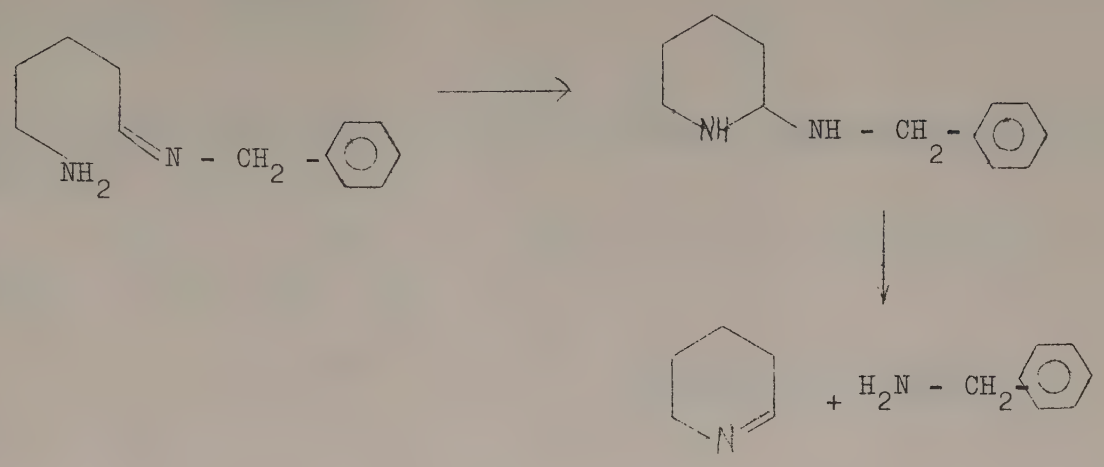




Colonne CARBOWAX 20 M (20 pieds)

à 175°

Cependant le milieu ne doit pas contenir d'eau, ce qui suppose un passage direct de la base de SCHIFF à la pipéridéine :



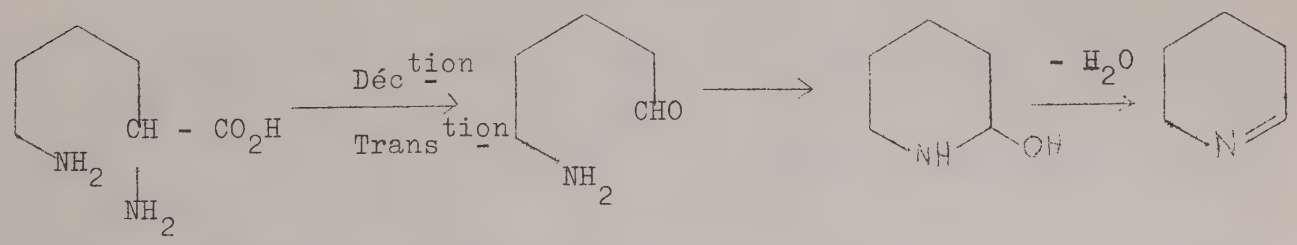
L'hypothèse de la formation de pipéridéine s'appuie en outre sur les faits suivants :

- Le chromatogramme (CPV) de pipéri technique, connu pour contenir cette pipéridéine en impureté, présente un faible pic secondaire qui se superpose au pic A.

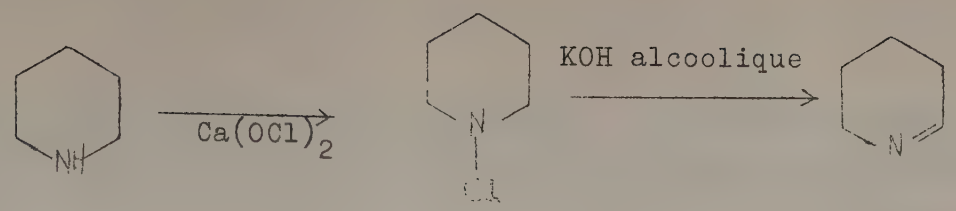
- Ce pic A donne en CCM une tâche jaune caractéristique des hétérocycles azotés.

A ce stade de la recherche, les résultats semblent difficiles à expliquer. D'après ce qui vient d'être dit, la pipéridéine devrait être responsable du pic A. Or c'est le pic B qui possède la formule brute de la pipéridéine : C_5H_9N. De plus, le pic B donne en CCM, la même tâche jaune que les pic A.

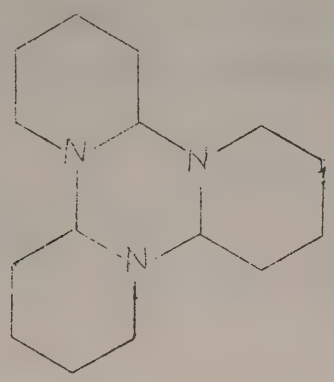
Nous avons eu un éclaircissement en nous référant aux travaux de SCHÖPF et coll.[42] sur la Δ^1 pipéridéine. Il est d'ailleurs curieux de constater que ces auteurs ont écrit que l'on pourrait théoriquement obtenir la pipéridéine par décarboxylation et transamination de la lysine. Ils proposent les réactions suivantes :



Ils ont cependant essayé de préparer la pipéridéine par une toute autre voie :



En fait ils constatèrent que l'on isole jamais la pipéridéine mais son trimère :

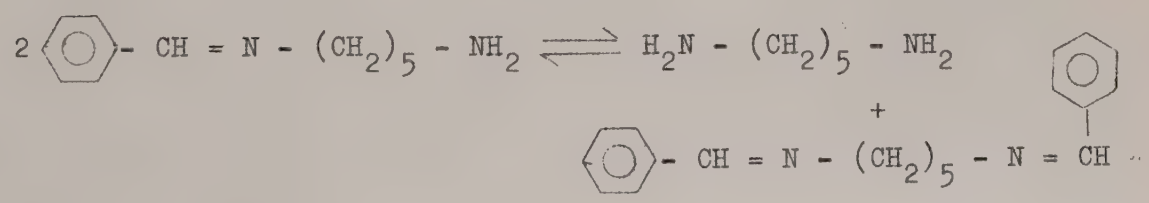


$(C_5H_9N)_3$, F = 61-2°

C'est pourquoi nous pensons que le pic B n'est autre chose que le trimère de la pipéridéine. En effet, sans purification, le produit du pic B fond à 50 - 60°.

Le fait que les pics A et B se comportent en CCM comme un produit unique signifie que le trimère régénère le monomère au contact de l'éluant qui est acide. SCHÖPF indique en effet que la régénération a lieu en milieu acide.

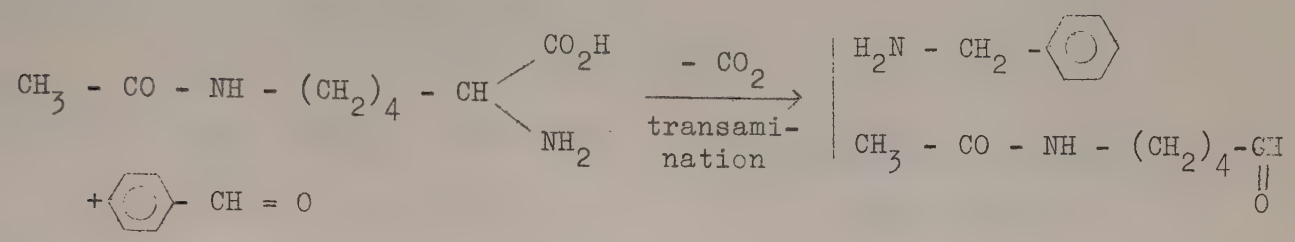
On peut se demander comment, à partir de la seule base de SCHIFF décarboxylée, il peut se former de la cadavérine libre. Nous pensons qu'il s'agit, là encore, du phénomène d'échange entre les fonctions amine et azométhine :



La base libre étant seule distillable, l'équilibre se déplacerait totalement vers la droite, de façon à libérer par distillation la moitié de la cadavérine disponible.

Nous avons voulu confirmer le rôle joué par la fonction ε-amine dans la formation de la pipéridéine. Il suffisait de bloquer cette fonction, donc d'utiliser l'ε -acétyl-lysine. Effectivement, en décarboxylant celle-ci en présence de benzaldéhyde dans le TEG, on ne retrouve que mono-acétyl-cadavérine et benzylamine dans le mélange final.

Pourtant il devrait se former un ε-acétyl-amino pentanal à la place de la pipéridéine, par un mécanisme analogue :



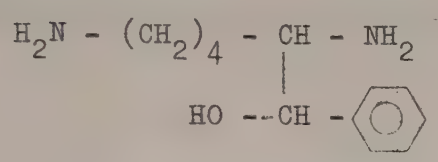
Nous n'avons pu le vérifier, ce composé n'étant pas révélable avec la ninhydrine.

VI - La décarboxylation de l'ε benzylidène-lysine en présence de benzaldéhyde

Si l'on ajoute une mole de base de SCHIFF, la décarboxylation est très vive et se calme après 10 mn de dégagement gazeux.

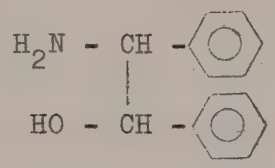
Dans ces conditions, le mélange issu de la réaction se révèle contenir quatre amines.
Deux d'entre elles sont la cadavérine et la benzylamine. Les deux autres sont nouvelles. Nous avons alors pensé aux réactions d'hydroxy-alcoylation de HAMMICK. Son schéma réactionnel prévoit que l'on peut obtenir, dans le cas de la lysine, les dérivés suivants :

- S'il n'y a pas de transamination :



(γ amino-butyl) 1, phényl 2, éthanol-amine

- S'il y a transamination :



diphényl 1,2 éthanol-amine

Ce composé dont la structure est indépendante de la lysine avait été déjà signalé par HAMMICK, AKABORI, et EMOTO.
L'une des amines inconnues se révèle être effectivement la diphényl-éthanol-amine. En effet, le produit obtenu par synthèse donne en CCM exactement la même tâche que l'une des tâches du mélange réactionnel.
Quant à la seconde amine, nous n'avons pu faire la même comparaison, du fait de la difficulté d'atteindre la γaminobutyl 1, phényl 2, éthanol-amine par synthèse. Cependant, à la suite d'extractions répétées sur un mélange de chlorydrates issu de l'hydrolyse du milieu, nous avons isolé une substance dont le taux d'azote correspond à la γamino-butyl - 1, phényl - 2, éthanol-amine. (Voir partie expérimentale)
L'identification d'un tel produit pose un problème qui pourrait être assez facilement résolu par la chromatographie préparative en phase liquide, telle qu'elle est utilisée notamment dans la séparation des mélanges d'acides aminés.

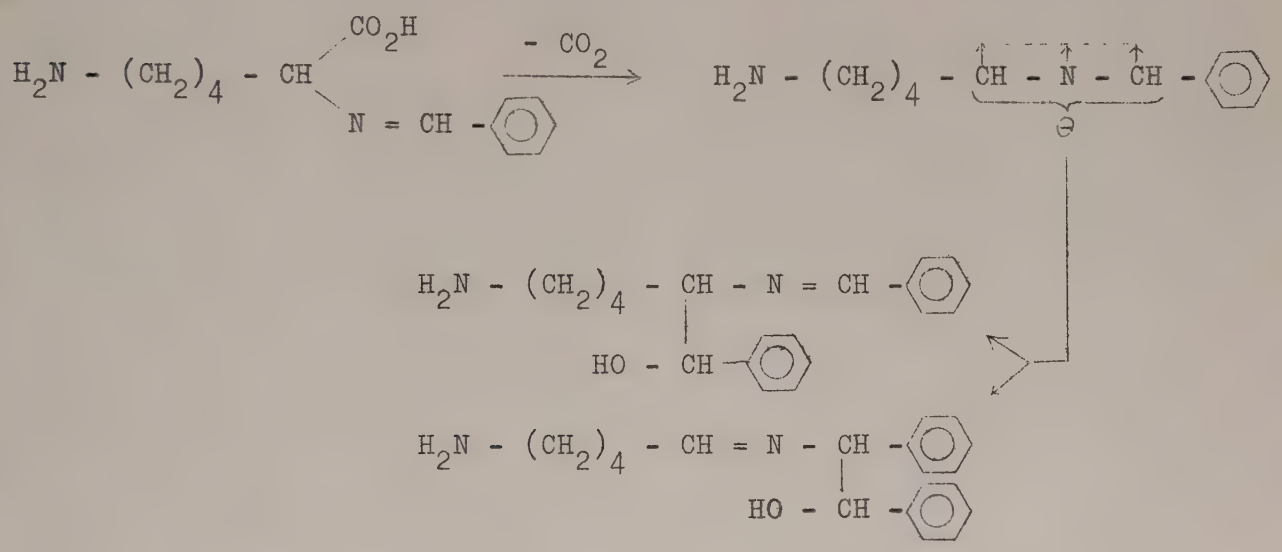
Ainsi le mécanisme de la réaction est différent lorsqu'on ajoute du benzaldéhyde. Afin de savoir si des modifications supplémentaires intervenaient en augmentant le rapport aldéhyde/lysine, nous avons réalisé la

décarboxylation au sein même du benzaldéhyde.

Dans ce cas, on retrouve les quatre mêmes substances, avec accroissement de la proportion des produits d'hydroxy-alcoylation.

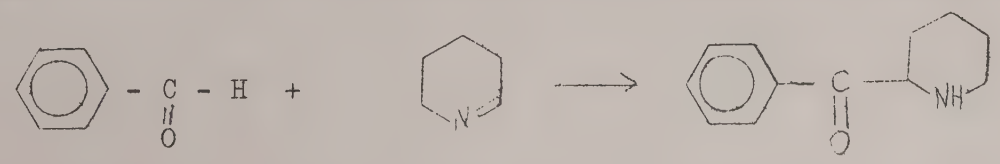
On peut se demander si la fonction ε amine joue un rôle dans la formation de ces produits. Une réponse positive est fournie par l'emploi de l' ε acétyl-lysine. En effet, la décarboxylation de l'ε acétyl-lysine dans le benzaldéhyde ne donne aucune éthanol-amine. En revanche, on trouve en plus de la mono-acétyl-cadavérine et de la benzylamine, un peu de cadavérine, ce qui suppose un déplacement du groupe acétyle par le benzaldéhyde.

Il est difficile d'expliquer le rôle de la fonction ε -amine, puisqu'elle n'intervient pas dans la réaction d'hydroxy-alcoylation :



Cependant EMOTO et ANDO avaient remarqué que cette hydroxy-alcoylation est favorisée en milieu basique. Or la fonction ε -amine rend justement le milieu basique. Sa basicité diminuant beaucoup par acétylation, on peut supposer que l'hydroxy-alcoylation n'est plus possible dans ces conditions.

Un autre problème se pose. Théoriquement, toute transamination conduit à une formation de pipéridéine. Or celle-ci n'apparaît pas dans cette série d'essais, bien que la présence de benzylamine indique qu'il y a eu transamination. Là encore, on ne peut qu'émettre l'hypothèse que la pipéridéine formée s'additionne au benzaldéhyde pour donner une benzoyl 2 pipéridine



Nous n'avons pu vérifier cette hypothèse, un tel composé n'étant pas révélable par la ninhydrine.

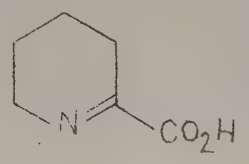
Nous avons été amenés à proposer cette hypothèse à la suite des observations de ZUMAN[39] tendant à montrer la parenté existant entre les fonctions carbonyle et azométhine. En effet, le mécanisme que nous proposons est analogue à la benzoïnation, la fonction azométhine de la pipéridéine jouant le rôle du second carbonyle.

VII - Résumé des résultats

la filiation des divers composés que donne la ε-benzylidène-lysine par décarboxylation figure dans le tableau suivant.

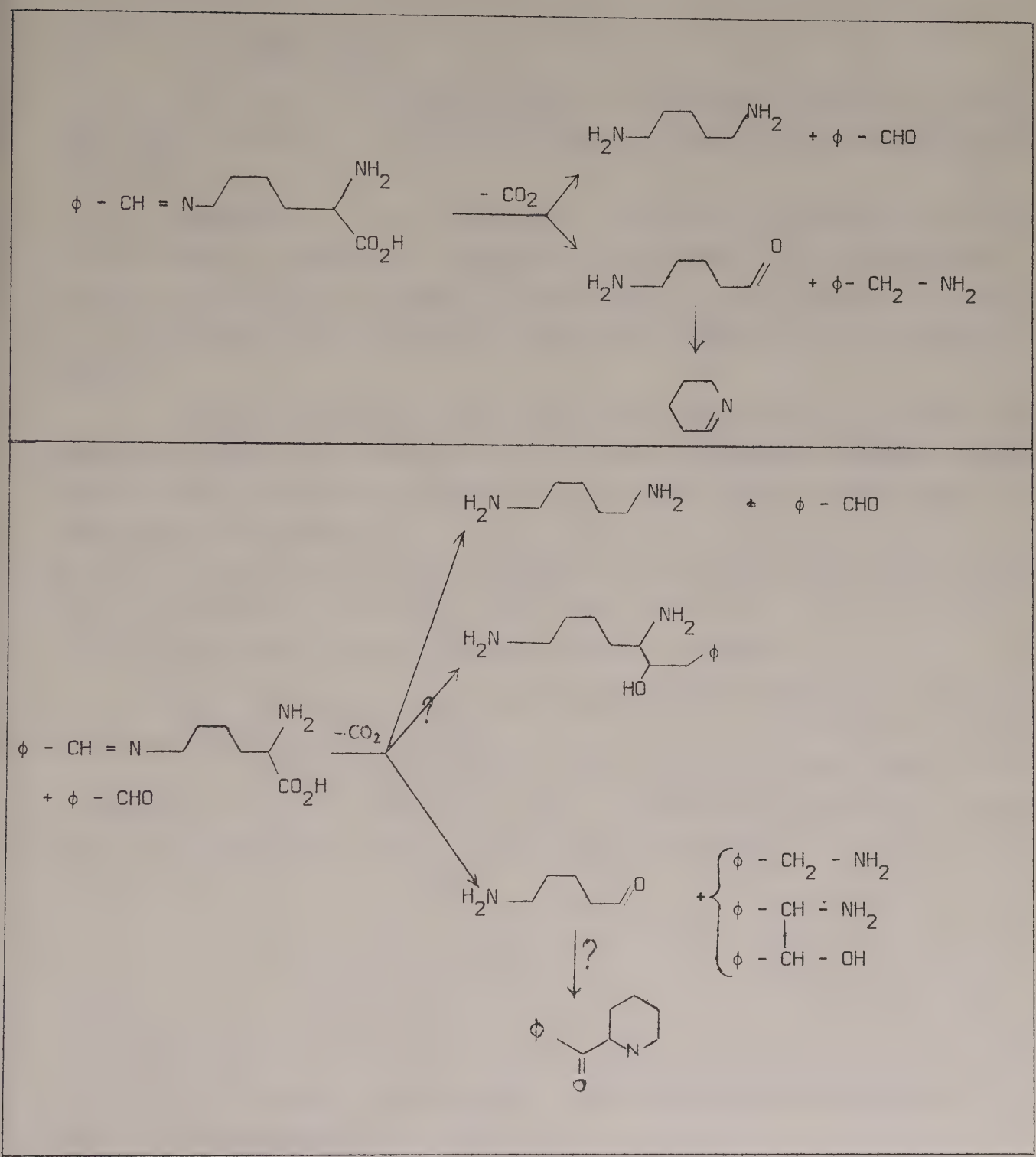
Nous voyons que le benzaldéhyde donne lieu à une transamination de 50 % environ. Celle-ci transforme la lysine en pipéridéine et le benzaldéhyde en benzylamine.

Ce résultat est à rapprocher de ceux de MEISTER[43] montrant que la transamination enzymatique de la lysine, portant sur la fonction α-amine est suivie par une cyclisation donnant l'acide tétra hydro-picolinique :



On obtient un abaissement appréciable du seuil thermique en ajoutant un équivalent de benzaldéhyde, lequel donne en contre-partie une réaction d'hydroxy-alcoylation. Cette réaction qui forme des éthanol-amines ne se produit pas si la fonction ε-amine est acétylée.

Résumé des réactions produites par le benzaldéhyde



ETUDE COMPARATIVE DE LA DECARBOXYLATION DE LA LYSINE AVEC DIVERS ALDEHYDES ET CETONES

I - Introduction

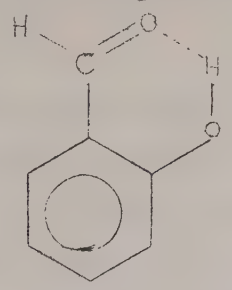
L'étude de la décarboxylation de la lysine en présence de benzaldéhyde nous montre que cet aldéhyde ne peut convenir à une préparation de la cadavérine.

Cependant, il nous a permis de connaitre les réactions parasites qui concourent à diminuer le rendement en cadavérine. Cette connaissance devrait nous permettre de juger du comportement de tout aldéhyde ou cétone à la décarboxylation, à partir de l'analyse en CCM du produit de décarboxylation.

Nous avons choisi 4 substances carbonylées connues pour avoir des propriétés chimiques différentes. Si le choix d'un groupe carbonyle conjugué avec un noyau aromatique s'imposait, il s'avérait moins évident entre les aldéhydes et les cétones.
En effet, les premiers avaient l'avantage de la réactivité et les secondes, celle de l'absence de réactions d'hydroxy-alcoylation.

Les quatre composés choisis sont les suivants :

- p - méthoxy-benzaldéhyde (anisaldéhyde), caractérisé par un substituant donneur d'électrons.
- o - hydroxy-benzaldéhyde (salicylaldéhyde), caractérisé par un substituant donneur d'électrons, mais possédant par rapport aux isomères m et p une réactivité accrue par une liaison hydrogène :



- p - nitro - benzaldéhyde, caractérisé par un substituant attracteur d'électrons.
- phényl - méthyl - cétone (acétophénone).

II Essais avec l'anisaldéhyde

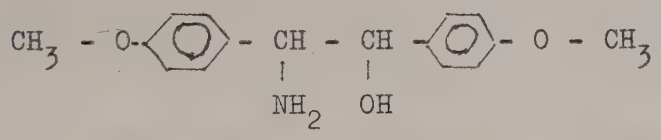
a) Formation de la base de SCHIFF : avec cet aldéhyde, la condensation apparait comme bien moins rapide qu'avec le benzaldéhyde mais donne toujours une base de SCHIFF insoluble avec un bon rendement. Ce composé ne semble pas avoir été déjà préparé.

b) Décarboxylation de la ε-anisylidène-lysine : nous avons d'abord décarboxylé la base de SCHIFF seule dans le TEG. La réaction débute à 160°, et comme avec le benzaldéhyde, s'accompagne d'une homogénéisation du milieu.

L'analyse en CCM du produit de réaction révèle la présence de 3 amines. On reconnait la cadavérine et l'amine de transamination, la p-methoxy-benzylamine. Quant à la troisième, elle était trop faible pour se prêter à un isolement.

Le taux de transamination semble légèrement plus faible que dans le cas du benzaldéhyde.

En décarboxylant l'anisylidène-lysine en présence d'un équivalent d'anisaldéhyde, on observe encore un abaissement du seuil thermique jusqu'à 125°. Dans ce cas, la composition du produit de réaction ne diffère du premier essai que par l'apparition d'une quatrième amine :



di(p-méthoxy-phényl) 1,2 éthanol-amine

Ce produit avait déjà été obtenu par TAKAGI[44] à partir de l'alamine et l'anisaldéhyde.

Ainsi, conformément aux résultats de DOSE, l'emploi d'un benzaldéhyde porteur d'un groupe donneur d'électrons diminue le taux de transamination. Pourtant, la diminution que nous avons observée (de 50 à 40 % environ) est plus faible que celle obtenue par DOSE, avec la valine (de 66 % à 50 %).

III 6 Essais avec le salicylaldéhyde

a) Formation de la base de SCHIFF : Avec cet aldéhyde, la condensation est immédiate,et, semble-t-il, légèrement exothermique. On obtient un précipité jaune, facile à isoler et purifier. Il est légèrement soluble dans l'alcool.

Ce composé avait déjà été ioslé par BERGMANN et ZERVAS, puis par WITKOP et BEILER. Nous n'avons jamais pu obtenir la di-salicylidène-lysine. Pourtant, le sel de cuivre de cette double base de SCHIFF est connu[24].

b) La décarboxylation de la salicylidène-lysine : La base de SCHIFF seule se décarboxyle vers 170° dans le TEG en donnant un milieu homogène d'une teinte orange assez vive. L'analyse en CCM ne permet de trouver que deux produits de réaction : la cadavérine et un peu d'une amine inconnue, qui n'est pas l'amine de transamination. Sa faible proportion ne nous a pas permis de l'identifier.

Toutefois, nous ne pouvons affirmer l'absence totale de transamination, car l'o-hydroxy-benzylamine ne se révèle que faiblement en jaune avec la ninhydrine, de sorte qu'une faible quantité de cette amine peut passer inaperçue.

Lorsqu'on opère avec un équivalent d'aldéhyde en plus, la réaction débute à 135°. Le milieu contient cette fois une petite quantité d'o-hydroxy-benzylamine. Le taux de transamination ne dépasse pas 25 %.

On a donc, avec l'aldéhyde salicylique, confirmation de l'influence inhibitrice du groupe - OH, donneur d'électrons, sur la transamination.

IV - Essais avec le p-nitro-benzaldéhyde

a) Formation de la base de SCHIFF : L'aldéhyde étant solide, il est nécessaire d'en faire une solution saturée dans l'alcool pour obtenir des résultats comparables avec les autres aldéhydes.

Dans ces conditions, il y a précipitation à froid d'un solide jaune pâle, la réaction étant apparemment un peu plus rapide qu'avec le benzaldéhyde.
La condensation ne porte toujours que sur une fonction amine de la lysine.

Cette base de SCHIFF n'a jamais été signalée par la littérature.

b) La décarboxylation de la p-nitro-benzylidène-lysine :
La décarboxylation de la base de SCHIFF dans le TEG débute vers 150° et se poursuit assez lentement en donnant une solution visqueuse de couleur foncée.

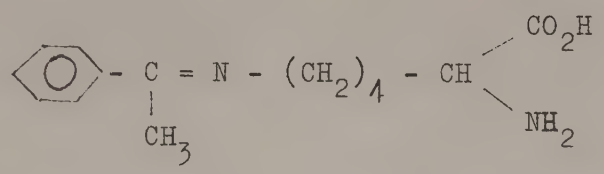
La composition du milieu se révèle assez complexe à l'analyse en CCM. Parmi 4 ou 5 tâches, toutes peu importantes, on reconnait la p-nitro-benzylamine, mais aucune ne correspond à la cadavérine. L'absence de cadavérine semble indiquer que le taux de transamination est voisin de 100 %.

En présence d'un équivalent d'aldéhyde, la base de SCHIFF se décarboxyle vers 90°, ce qui révèle en effet catalytique puissant. On retrouve la p-nitro-benzylamine en CCM, mais il apparait plusieurs tâches nouvelles.

Comme le laissait prévoir son substituant attracteur d'électrons, le p-nitro-benzaldéhyde favorise nettement la transamination. Mais, sans doute à cause de sa très grande réactivité, il donne lieu à de nombreuses réactions secondaires.

V - Essais avec l'acétophénone

a) Formation de la base de SCHIFF : il fallait s'attendre à une très faible réactivité de la part de l'acétophénone. Effectivement, on n'observe aucune précipitation dans les conditions des autres condensations. Au bout de quelques jours seulement, il se forme un solide blanc reconnaissable comme produit de condensation d'une molécule de lysine avec une molécule d'acétophénone.:



Ce produit nouveau est assez fragile et se décompose en présence d'eau : la réaction de condensation n'est que partielle.

Nous avons pu accélérer la condensation en opérant à chaud et la précipitation en refroidissant fortement. Mais la base de SCHIFF précipite à l'état colloïdal, ce qui rend la séparation et la purification laborieuses.

b) La décarboxylation de la méthyl-benzylidène-lysine : Bien que d'une pureté d'environ 90 % la base de SCHIFF a pu être décarboxylée en présence d'un équivalent d'acétophénone, dans le TEG. La réaction débute vers 140° et se poursuit assez rapidement jusqu'à un rendement de 100 %.

L'analyse en CCM montre qu'il s'est formé seulement de la cadavérine avec une faible trace d'une amine inconnue. Le taux de transamination est donc pratiquement nul.

L'amine inconnue,qui n'est pas l'amine de transamination, n'a pu être reconnue, là encore, à cause de sa trop faible proportion. Cependant, cette amine semble identique à celle qui se forme, aussi en faible proportion, par décarboxylation de la salicylidène-lysine.

VI - Conclusion des essais avec divers aldéhydes et cétones.

Les quatre aldéhydes utilisés ont l'avantage de former aisément des bases de SCHIFF de la lysine, ce qui permet de décarboxyler sans eau. Le benzaldéhyde, l'anisaldéhyde et le p-nitro-benzaldéhyde présentent un grand pouvoir catalytique, mais sont à exclure en raison des transaminations et hydroxy-alcoylations auxquelles ils donnent lieu.

Le salicylaldéhyde produit une proportion intéressante de cadavérine mais la présence d'autres composés dans le milieu réactionnel implique un problème de séparation, qui ne se pose pas dans le cas de l'acétophénone.

En outre, le fait que le salicylaldéhyde ait une certaine solubilité dans l'eau rendra difficile sa séparation d'avec les chlorhydrates d'amines.

Malgré l'inconvénient de sa faible réactivité, l'acétophénone convient bien à l'obtention pratique de la cadavérine. Du fait que la cadavérine est l'unique produit formé par la décarboxylation, il ne se pose pas de problème de séparation de produits analogues, mais seulement d'extraction d'un produit de son milieu.

VII - Essai de préparation de cadavérine

Nous avons opéré la décarboxylation de la base de SCHIFF avec 1,5 équivalent d'acétophénone, dans le p-cymène. La réaction débute à 125° et s'achève en deux heures.

La solution obtenue est traitée à chaud avec de l'acide chlorhydrique concentré, refroidie et extraite à l'éther qui dissout presque toute l'acétophénone alors libérée.

La cadavérine passe sous forme de chlorhydrate dans la phase aqueuse. En évaporant celle-ci on obtient un résidu que l'on reprend à chaud par de l'alcool absolu dans lequel le chlorhydrate est insoluble. On obtient cependant une solution par sursaturation. La cristallisation est provoquée par addition d'un peu d'éther de pétrole. On obtient alors un chlorhydrate de cadavérine pur, avec un rendement de 25 %, calculé à partir de la base de SCHIFF.

Ainsi, si cette méthode est la plus intéressante du point de vue théorique, il existe en pratique deux étapes qui méritent une mise au point : la formation de la base de SCHIFF et l'hydrolyse du produit de décarboxylation.

PARTIE EXPERIMENTALE

P. 43 La décarboxylation

P. 43 Bases de SCHIFF lysine-aldéhydes, lysine-acétophénone.

P. 45 Préparation des ε et α acétyl-lysine

P. 48 Isolement de la pipéridéine

P. 49 Hydrolyse des produits de réaction

P. 51 Chromatographie sur couches minces

P. 52 Dosages d'azote

P. 54 Spectres I.R. et R.M.N.

LA DECARBOXYLATION

1) Technique

La réaction se passe dans un appareil étanche, parcouru par un courant d'azote qui a un triple rôle :

- Inertie de l'atmosphère
- Entrainement du CO_2
- Agitation du milieu par barbotage

Le rendement en CO_2 est calculé à partir de la variation de poids de 2 absorbeurs remplis l'un de chaux sodée, l'autre d'ascarite (amiante sodée).

L'ascarite a pour rôle d'absorber l'eau dégagée par la chaux sodée, par suite de son échauffement. Auparavant, une absorbeur à H_2SO_4 retient toutes les vapeurs susceptibles d'être entrainées par l'azote.

Lorsqu'on procède à une évaluation du seuil thermique de la décarboxylation, le chauffage se fait par l'intermédiaire d'un bain d'huile.

2) Appareil : ci-après.

3) Conduite de la réaction

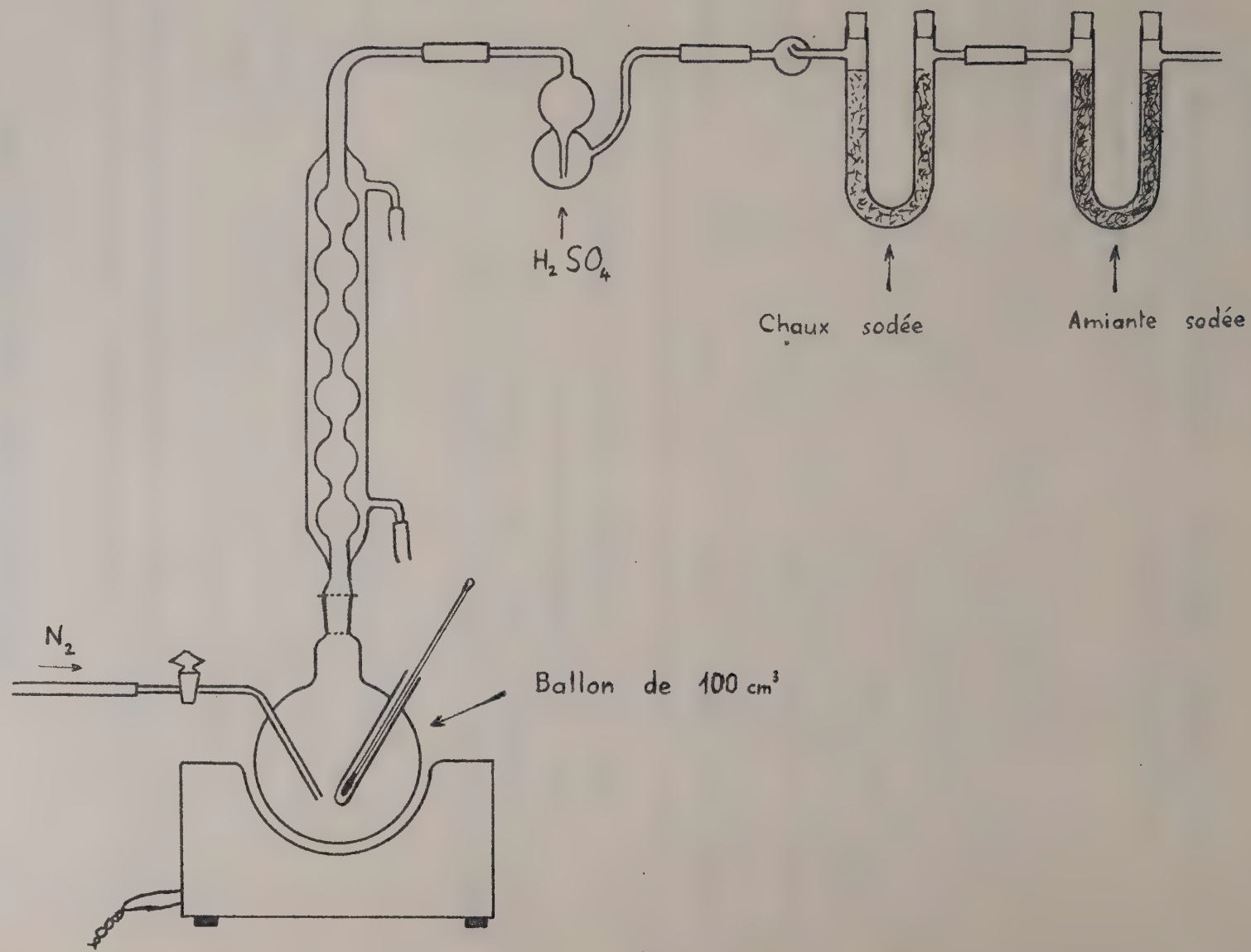
Après avoir pesé exactement les absorbeurs, on introduit 3g de base de SCHIFF dans environ 50 cm^3 de solvant adéquat. On fait doucement barboter l'azote et on chauffe progressivement. La réaction, annoncée par la dissolution de la base de SCHIFF, le dégagement gazeux dans le milieu et l'échauffement de la chaux sodée, se termine au bout de 2 à 4 heures.

On pèse à nouveau les absorbeurs, La somme des gains de poids de chaque absorbeur donne le poids de CO_2 dégagé.

BASES DE SCHIFF ENTRE LYSINE ET ALDEHYDES

Ces préparations montrent que l'on peut effectuer la condensation d'un aldéhyde directement avec la lysine libre en solution.

On ajoute progressivement sous bonne agitation 1,5 mole d'aldéhyde dans l'alcool (solution à 40 %) à 1 mole de lysine en solution aqueuse (à 50 %). On obtient assez rapidement un précipité plus ou moins visqueux. On peut diminuer la viscosité par addition d'alcool. On filtre, essore, rince à l'alcool, épuise à l'éther, et sèche au dessicateur.



Appareil à décarboxylation

Les vitesses de condensation se classent ainsi :

Salicylaldéhyde
p-nitro-benzaldéhyde
benzaldéhyde
anisaldéhyde

↑ vitesse croissante

La pureté des bases de SCHIFF est évaluée par dosage d'azote. Cette pureté n'est que relative, comme le montre le tableau suivant, mais convient bien aux décarboxylations.

Base de SCHIFF de la lysine avec :	N %(théorique)	N%(trouvé)	F(déc.)	Rt	Couleur
Salicylaldéhyde	11,20	11,10	244°	90 %	Jaune vif
p-nitro-benzaldéhyde	10,02	10,01	189°	90 %	Jaune pâle
benzaldéhyde	11,95	11,85	249°	92 %	Blanc
anisaldéhyde	10,60	10,50	244°	80 %	Blanc

Cf. WITKOP et BEILER : ε -benzylidène-lysine ... F = 205°
ε salicylidène-lysine .. F = 205°

A l'exception de la salicylidène-lysine qui est légèrement soluble dans l'alcool, toutes les bases de SCHIFF sont insolubles dans les solvants suivants :

eau	ether	diméthysulfoxyde
alcool	chloroforme	hexamétapol
benzène	p-cymène	acétate d'éthyle
pyridine	squalane	sulfure de carbone
		triéthylène-glycol

Il y a une dissolution apparente dans la soude, l'acide chlorhydrique et l'acide acétique qui, en fait, provoquent une hydrolyse immédiate.

BASE DE SCHIFF ENTRE LYSINE ET ACETOPHENONE

On chauffe à 75 ° pendant 2 heures le mélange :

| Acétophénone. . . . . 14 g
| Lysine . . . . . 20 g de solution aqueuse à 50 %
| Alcool . . . . . 100 cm^3

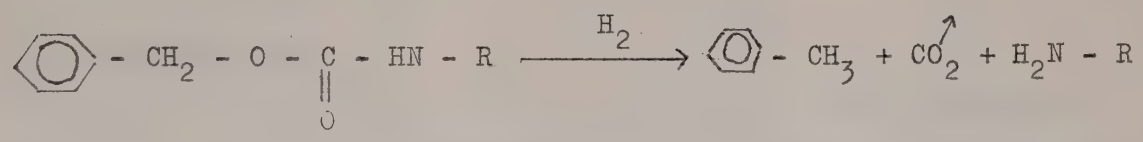
On laisse au réfrigérateur (0-5°) pendant 3 jours. On obtient un précipité gélifié, très difficile à filtrer. Un épuissement à l'éther laisse un solide blanc non cristallin.

. Rendement : 53 %
. Dosage N (Kjeldhal) : 11,90 % (théor. 11,30 %)
- ($HClO_4$) : 11,70 %
. F = 241°(déc.)

PREPARATION DES ε ET α ACETYL-LYSINE

On obtient l'ε acétyl-lysine par acétylation après blocage de la fonction α amine. Seul le cuivre, par formation d'un complexe, peut réaliser ce blocage. Ce complexe a de plus l'avantage de libérer ensuite l'ε acétyl-lysine par un traitement qui n'affecte pas la fonction amide.

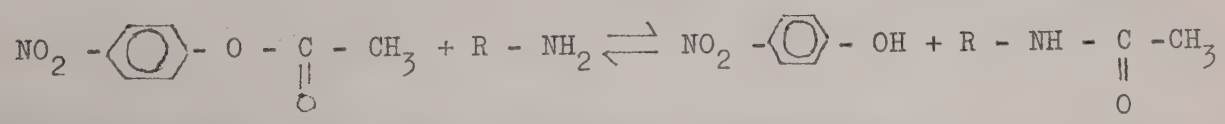
Pour l'α acétyl-lysine, on procède en 2 temps. On prépare d'abord une ε carbobenzoxy-lysine comme l'ε acétyl-lysine ce qui permet alors d'acétyler en α. On enlève facilement la radical carbobenzoxy par hydrogénation:



1) ε acétyl-lysine

Pour former le complexe cuivrique de la lysine, on fait réagir à froid 46 g de chlorhydrate de lysine avec 35 g de $Cu(OH)_2$ dans 1500 cm^3 d'eau. On agite le mélange pendant deux heures et on filtre l'excès de $Cu(OH)_2$ de la solution bleue fonçée obtenue.

L'acétylation se fait au moyen d'acétate de p-nitro-phényle qui est un acétylant doux, ne risquant pas de détruire le complexe. On agite donc pendant au moins 20 heures la solution de complexe avec 55 g d'acétate de p-nitro-phényle et 54 g de Na_2CO_3 pour déplacer l'équilibre :



L'ester n'étant pas soluble dans l'eau, on introduit 50 cm^3 d'acétate d'éthyle servant de milieu intermédiaire où se réalise l'acétylation.

On obtient un volumineux précipité vert et gommeux. La filtration en est assez pénible. On le sèche sur plaque poreuse, lave l'acétate d'éthyle puis à la soude (1 %) et enfin à l'eau .

Le produit bleu obtenu est dissout à chaud dans 1500 cm^3 d'acide acétique à 40 %. Toujours à chaud, on fait barboter H_2S et on filtre CuS en présence de terre adsorbante.

La solution incolore est évaporée sous vide en rajoutant de l'eau à la fin, pour aider au départ de l'acide acétique. On obtient 54 g de produit jaune impur.

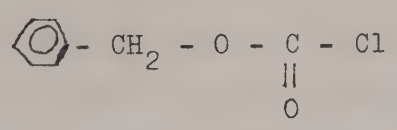
On recristallise cette acétyl-lysine brute dans un mélange hydro-alcoolique, ce qui donne 30 g de produit pur.

Rendement global : 65 %
Dosage N (Kjeldhal) : 14,90 % (théor. 14,90 %)
- ($HClO_4$) : 7,45 % (N dans amine libre)
F = 250° (déc.)

L'ε acétyl-lysine est très soluble dans l'eau, partiellement dans l'alcool.

2) αAcétyl-lysine

On prépare la solution de complexe cuivrique comme précédemment. Cette solution est placée dans un réacteur refroidi dans la glace. On ajoute alternativement par portions 230 cm^3 de NaOH 8 % et 40 cm^3 de chloroformiate de benzyle* :

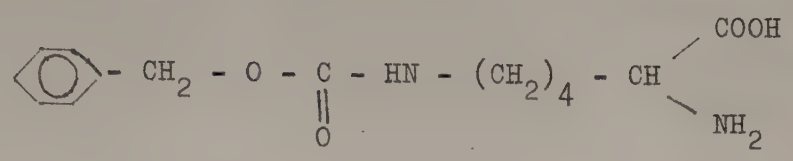


de manière à toujours centrer le pH autour de 8. On obtient 70 g de précipité bleu, qui est le complexe du dérivé.

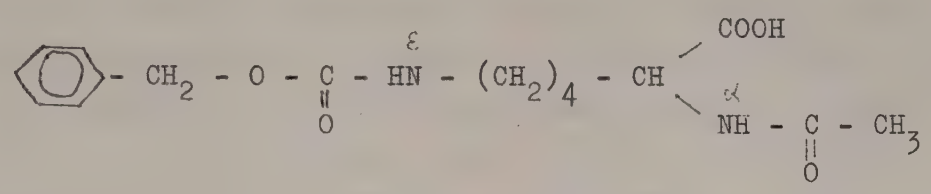
Ce complexe est mis en suspension à chaud dans 1000cm^3 d'acide acétique 40 % et soumis au barbotage de H_2S. On obtient un précipité gris, mélange de CuS et d' εcarbobenzoxy-lysine. On fait bouillir le tout : le

* "carbobenzoxychlorure" selon la terminologie anglosaxonne

dérivé se dissout, ce qui permet de séparer CuS par filtration, toujours à chaud. Par concentration et refroidissement énergique, le filtrat libère des cristaux blancs. On obtient ainsi environ 25 g d' ε carbobenzoxy-lysine pure :



On dissout ce dérivé dans NaOH 4 % et on effectue une acétylation classique par l'anhydride acétique, en maintenant le pH autour de 8. Cette opération consomme au total environ 300 cm^3 de NaOH 4 %. On acidifie ensuite avec HCl(2N) jusqu'à précipitation. Le précipité est extrait à chaud dans de l'acétate d'éthyle. On concentre cet extrait et amorce la cristallisatiion en ajoutant un peu d'éther de pétrole. On obtient ainsi 21 g d' ε carbobenzoxy- αacétyl-lysine :



L'hydrogénation est réalisée par la méthode indiquée par GREENSTEIN*, ainsi que la préparation du catalyseur :

ε - CB - α Ac-lysine	20 g
Méthanol	300 cm^3
Noir de Palladium.	8 g

L' αacétyl-lysine précipite en cours de réaction. Il n'y a plus de dégagement de CO_2 au bout de 8 heures. On ajoute un peu d'eau pour dissoudre le précipité et on filtre le noir de Pd. On concentre le filtrat sous vide jusqu'à obtenir un sirop. On provoque une cristallisation par addition d'alcool et refroidissement énergique. Le solide blanc obtenu est rincé à l'alcool chaud et séché. On obtient ainsi 10 g d'α acétyl-lysine pure.

Rendement global : 21,3 %
Dosage N (Kjeldhal) : 14,90 % (Théor. 14,90 %)
- ($HClO_4$) : 7,45 %
F = 237 ° (déc.)

* GREENSTEIN J.P. et WINITZ M., Chemistry of the Amino Acids, II, 1233 et 1234

3) Préparation de l'acétate de p-nitro-phényle

On traite 70 g de p-nitro-phénol par 26 g de NaOH dans 300 cm^3 d'eau. On obtient un phénate orange partiellement insoluble. On refroidit, ajoute 100 g de glace pilée et, rapidement, 56 cm^3 d'anhydride acétique. On agite vigoureusement quelques minutes. Il se forme un précipité jaune pâle qu'on filtre, lavec avec un peu de soude diluée, de l'eau et sèche au dessicateur.

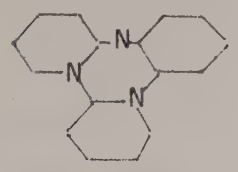
On a alors environ 100 g de produit de pureté acceptable.

F = 76° (théor. 79°)

ISOLEMENT DE LA PIPERIDEINE

On effectue une décarboxylation de 50 g de benzylidène-lysine dans 250 cm^3 de TEG à 160°. La réaction est vive et totale au bout de 2 heures. On distille alors grossièrement le produit de réaction, de manière à récupérer tout ce qui passe de 75 à 130° sous 13 mm de Hg. On recueille ainsi environ 20 cm^3 d'un liquide incolore, dont l'analyse indique qu'il s'agit d'un mélange de pipéridéine, benzylamine et cadavérine en quantités approximativement égales. La séparation de la pipéridéine se fait par CPV préparative (pic 2 du chromatogramme). On obtient environ 1 cm^3 d'un liquide tendant à cristalliser. Il s'agirait du trimère, les travaux de SCHÖPF et coll.* ayant montré que la forme monomère est instable.

F = 50 - 60° (Théor. 61°)



$(C_5H_9N)_3$

Cette formule se vérifie dans l'analyse élémentaire, aux écarts près, dus à l'imprécision de la séparation : Analyse :

Calc. % :	C 72,4	H 10,8	N 16,8
Tr.	70,4	10,98	15,8

* SCHÖPF et coll., Ann. der Chemie, 1947, 559, 1

HYDROLYSE DES PRODUITS DE DECARBOXYLATION

Nous n'avons effectué d'hydrolyse que sur les produits de décarboxylation de la lysine avec le benzaldéhyde ou l'acétophénone. Nous avons vu que dans le cas de l'acétophénone on isole ainsi le chlorydrate de cadavérine. Dans le cas du benzaldéhyde l'hydrolyse pose un problème difficile. Les difficultés proviennent d'une part de la présence de plusieurs substances dans le milieu, d'autre part de la réactivité propre du benzaldéhyde vis-à-vis de l'acide chlorhydrique.

Ainsi, que la décarboxylation ait eu lieu dans le p-cymène ou le benzaldéhyde même, on observe que l'hydrolyse du milieu par une solution aqueuse de HCl donne toujours un système de 3 phases :

- Une phase soluble dans l'éther qui contient la plus grande partie du benzaldéhyde.
- Une phase aqueuse qui contient les chlorhydrates
- Une phase huileuse, de composition inconnue, soluble seulement dans l'alcool et le chloroforme, présentant un certain caractère macromoléculaire.

L'évaporation de la phase aqueuse ne permet pas d'isoler une substance pure mais laisse souvent un mélange gommeux.

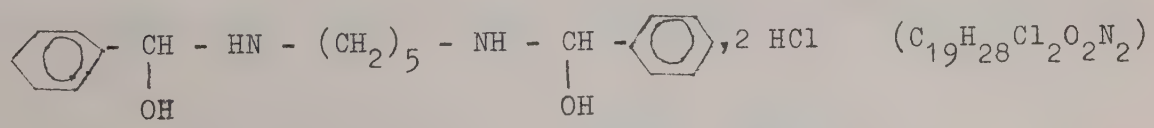
Cependant, 3 hydrolyses effectuées dans des conditions particulières ont conduit à des substances pures, sans que nous puissions expliquer le processus de leur séparation.

1) <u>Premier cas</u>

La réaction met en jeu 20 g de benzylidène-lysine dans 70 cm^3 de benzaldéhyde. La décarboxylation se fait à 100° et se termine en 1 heure. On distille alors tout le benzaldéhyde possible. Le résidu est traité à froid par un peu de H_2SO_4 dilué puis par HCl concentré dans l'alcool. On obtient un chlorhydrate pur par évaporation et recristallisation dans l'alcool absolu. L'analyse élémentaire donne :

Tr. % C 59,7 H 7,8 N 7,2 Cl 18,3

Ces données conduisent à penser que ce produit résulte d'une hydratation de la di-benzylidène-cadavérine (Cf. SMITH) :



bis N (phényl, hydroxy-méthyl) cadavérine

Théor. : C % = 59,0 H % = 7,25 N % = 7,25 Cl % = 18,3

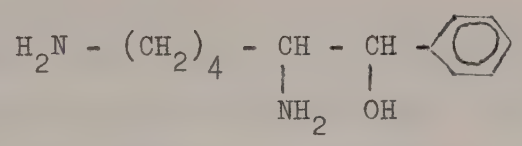
La spectroscopie infra-rouge ne fournit pas d'éléments suffisants pour confirmer cette hypothèse.

2) Deuxième cas

La réaction se fait aussi au départ de la benzylidène-lysine dans le benzaldéhyde. On distille tout le benzaldéhyde après réaction et on hydrolyse le résidu avec HCl concentré dans l'alcool. Par évaporation complète de la solution alcoolique on obtient un résidu gommeux. On le reprend à l'eau et lave cette solution au chloroforme. On chasse ensuite toute l'eau et on renouvelle l'opération. Il reste alors une laque marron correspondant à une substance pure. Cette substance est incristallisable et se caractérise par une odeur fruitée.

Analyse : Tr. % N 8,8 Cl 22,5

En tenant compte des résultats exposés dans la partie théorique (décarboxylation de la benzylidène-lysine en présence de benzaldéhyde), nous pensons qu'il s'agit d'un produit d'addition de la cadavérine et du benzaldéhyde :



(γ aminobutyl)1, phényl2 - éthanol-amine

En fait, le produit isolé serait un dihydrate du di-chlorhydrate :

$C_{12}H_{20}ON_2$, 2 H_2O, 2 HCl Analyse Calc. % N 8,85 Cl 22,4

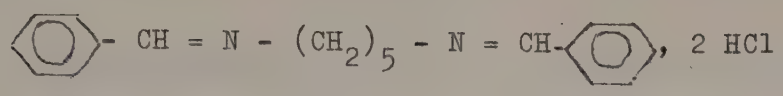
Malheureusement nous n'avons pas pu reproduire cet isolement en vue d'analyses plus complétes.

3) Troisième cas

La réaction se fait avec 3 g d'ε acétyl-lysine dans 50 cm^3 de benzaldéhyde. La décarboxylation est rapide et totale à 120°. On distille le benzaldéhyde et on traite le résidu par HCl 5 %. Après extraction à l'éther et évaporation, on obtient une laque marron, incristallisalbe.

N % = 7,9 Cl % = 19,8

Nous pensons qu'il s'agit du dichlorhydrate de la di-benzylidène-cadavérine :



(Théor. N % = 7,95 Cl % = 20,2)

Ce résultat semble anormal puisqu'une des deux fonctions amines devrait être acétylée. Cependant, il n'est pas impossible qu'il y ait eu un remplacement du groupe acétyle par le groupe benzylidène, selon un processus qui reste à déterminer.

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES

Les plaques sont préparées à l'aide d'un appareil SHANDON. L'épaisseur standard choisie pour la couche est de 250 µ . Pour 4 plaques de 20 x 20, on prépare le gel avec 40 g de silice MERCK "G" dans 72 cm^3 d'eau. Les plaques sont séchées 12 heures à température ambiante et activée par passage à l'étuve à 110°, pendant 30 mn.

Deux types d'éluant sont utilisés. Le premier, le plus fréquent est un mélange de n-butanol, acide acétique et eau dans le rapport 2/2/1. Le second, réservé aux substances fortement retenues par la silice telles que lysine ou cadavérine, est un mélange de chloroforme, méthanol et ammoniaque à 17 % dans le rapport 2/2/1.

La révélation se fait par chauffage à 110° (à l'étuve) pendant 4 à 6 mn après vaporisation du réactif suivant :

Ninhydrine	0,2 g
Alcool absolu.	100 cm^3
Acide acétique pur . . .	20 cm^3
Triméthyl-2,4,6-pyridine.	4 cm^3

Nous donnons ci-après un tableau de valeurs de Rf des substances connues rencontrées et un tableau récapitulatif des chromatogrammes obtenus à partir des différentes décarboxylations de la lysine. Les valeurs de Rf, nous le rappelons, ne sont jamais parfaitement reproductibles, mais se maintiennent généralement avec un écart de $\pm$ 15 %.

Notons que les bases de SCHIFF ne sont pas analysables par cette méthode, l'éluant provoquant une hydrolyse immédiate de sorte qu'on ne retrouve que l'amine de départ sur le chromatogramme.

DECARBOXYLATIONS DE LA LYSINE

Seuils thermiques et chromatogrammes CCM (schématiquement)

ZALDEHYDE	B de S	160°	cadavérine, pipéridéine, benzylamine
	BdeS + ald.	125°	?, di-Φ-ethanol-amine
	+ ac-lys	125°	acétyl-cadavérine
SALDEHYDE	B de S	160°	p-méthoxy-benzylamine
	B de S + ald.	130°	di(p-CH_3O-Φ)éthanol-ami
	+ ac-lys	130°	
p-Nitro NZALDEHYDE	B de S	150°	p-nitro-benzylamine
	B de S + ald.	90°	
	+ ac-lys	95°	
SALICYL-ALDEHYDE	B de S	170°	
	B de S + ald.	135°	o-hydroxy-benzylamine
	+ ac-lys	135°	
CETOPHENONE	B de S + AcΦ	140°	
	+ ac-lys	150°	

A - Eluant : butanol-acide acétique-eau

Lysine	0
Cadavérine	0,05
ε Acétyl-lysine	0,08
α Acétyl-lysine	0,07
Mono-acétyl-cadavérine	0,20
ε carbobenzoxy-lysine	0,35
Benzylamine	0,45
Pipéridéine	0,25
Diphényl 1,2 éthanol-amine	0,52

B - Eluant : chloroforme-méthanol-ammoniaque

Lysine	0,20
Cadavérine	0,14
ε Acétyl-lysine	0,68
α Acétyl-lysine	0,38
Benzylamine	0,72

DOSAGES D'AZOTE

1) Méthode à l'acide perchlorique

Une prise d'essai d'environ 100 mg est dissoute dans environ 20 cm^3 d'acide acétique pur. On titre avec une solution 0,1 M d'acide perchlorique dans l'acide acétique pur en présence de bleu "oracète B". L'acide perchlorique neutralise les amines en milieu acétique et dès qu'il est en excès, l'indicateur vire du bleu au rose.

Cette méthode convient seulement aux fonctions amines libres. Les azométhines sont aussi dosables en raison de leur hydrolyse immédiate dans l'acide acétique. Les chlorhydrates et les amides ne sont pas dosables. Toutefois, la réaction des amides n'est pas totalement négative car ils subissent une hydrolyse partielle. Ainsi, dans le cas des acétyl-lysines, on ne dose qu'une fonction amine, mais le virage n'est pas net à cause d'une faible hydrolyse de la fonction amide.

2) Méthode KJELDHAL

Les acides aminés se minéralisent souvent avec difficulté. La lysine, en particulier, peut se dégrader en pipéridine , très résistante à la chaleur.

Nous avons donc été amenés à utiliser une méthode adaptée au cas des acides aminés, méthode tirée d'un document non publié :

- Prise d'essai contenant environ 10 mg d'azote (50 à 200 mg)
- Mélange d'attaque : H_2SO_4 5 cm^3
  K_2SO_4 2 g
  $HgSO_4$ 250 mg
- Chauffer jusqu'à décoloration totale, plus une heure
- Transvaser dans l'appareil à distiller l'ammoniaque
- Neutraliser par NaOH (50 %) et ajouter 10 cm^3 de $Na_2S_2O_3$, pour précipiter tout le mercure, susceptible de retenir de l'ammoniac sous forme de complexes.
- Condenser dans environ 25 cm^3 de H_3BO_3 (2 %) avec 10 gouttes de réactif de TASHIRO.
- Distiller 15 mn. Toute trace d'ammoniaque provoque une coloration verte.
- Titrer par H_2SO_4 N/10 jusqu'à retour à la coloration initiale (pourpre).

Réactif de TASHIRO

- solution de rouge de méthyle 0,2 %
  dans l'alcool à 90° . . . . . 2 volumes
- solution de bleu de méthylène 0,1 %
  dans l'alcool à 90° . . . . . 1 volume

SPECTRES INFRA-ROUGE

Bases de SCHIFF	N°
ε benzylidène-lysine	1
ε salicylidène-lysine	2
ε p-nitro-benzylidène-lysine	3
ε p-méthoxy-benzylidène-lysine	4
ε méthyl-benzylidène-lysine	5
Dibenzylidène-cadavérine	6

Dérivés de la lysine	
Chlorhydrate de lysine	7
Complexe lysine-cuivre	8
ε acétyl-lysine	9
α acétyl-lysine	10
ε carbobenzoxy-lysine	11
ε carbobenzoxy, α acétyl-lysine	12

Produits de réaction	
Dichlohydrate de cadavérine	13
Pipéridéine	14

1) ε benzylidène-lysine (dans KBr)

690 - 748 - 960 - 1095 - 1150 - 1215 - 1265 - 1310 - 1325 - 1340 - 1410 - 1450 - 1500 - 1575 - 1620 - 2080 - 2325 - 2580 - 2660 - 2770 - 2850 - 2930 -

2) ε salicylidène-lysine (dans Kbr)

730 - 750 - 965 - 1115 - 1150 - 1205 - 1275 - 1345 - 1400 - 1455 - 1490 - 1580 - 1640 - 2100 - 2330 - 2630 - 2850 - 2930 - 3060 -

3) ε(p-nitro benzylidène)-lysine (dans Kbr)

690 - 745 - 833 - 1100 - 1340 - 1380 - 1510 - 1575 - 1600 - 2100 - 2350 - 2850 - 2930 - 3080 -

4) ε anisylidène - lysine (dans KBr)

825 - 1025 - 1100 - 1165 - 1250 - 1300 - 1400 - 1440 - 1500 - 1580 - 1600 - 2120 - 2330 - 2560 - 2830 - 2930 -

5) ε (Méthyl - benzylidène)-lysine (dans KBr)

690 - 755 - 1175 - 1280 - 1315 - 1345 - 1400 - 1440 - 1500 - 1575 - 1625 - 2120 - 2330 - 2600 - 2850 - 2930 -

6) Dibenzylidène-Cadavérine (dans $C\ Cl_4$)

645 - 690 - 825 - 960 - 1020 - 1070 - 1163 - 1200 - 1215 - 1290 - 1310 - 1335 - 1370 - 1450 - 1480 - 1580 - 1600 - 1640 - 1700 - 2730 - 2830 - 2940 - 3040 - 3080 -

7) Lysine- HCl (dans KBr)

670 - 760 - 777 - 795 - 865 - 905 - 1000 - 1140 - 1185 - 1330 - 1420 - 1510 - 1565 - 1620 - 2940 -

8) Complexe Lysine - Cu (dans KBr)

735 - 745 - 772 - 788 - 815 - 848 - 1025 - 1050 - 1150 - 1300 - 1335 - 1360 - 1400 - 1540 - 1610 - 2750 - 2820 - 3250 -

9) ε - Acétyl-lysine (dans KBr)

695 - 735 - 772 - 905 - 1030 - 1065 - 1090 - 1150 - 1170 - 1230 - 1290 - 1330 - 1340 - 1360 - 1410 - 1470 - 1540 - 1575 - 1630 - 2090 - 2850 - 2940 - 3300 -

10) α Acetyl-lysine (dans KBr)

647 - 708 - 732 - 777 - 900 - 930 - 955 - 1025 - 1105 - 1140 - 1160 - 1270 - 1300 - 1375 - 1435 - 1460 - 1600 - 2200 - 2 900 - 3150 - 3280 -

11) ε -carbo-benzoxy-lysine (dans KBr)

694 - 740 - 775 - 1010 - 1025 - 1145 - 1265 - 1315 - 1330 - 1410 - 1450 - 1540 - 1580 - 1620 - 1685 - 2870 - 2940 - 3050 - 3320 -

12) ε -carbo-benzoxy-α acétyl-lysine (dans KBr)

695 - 730 - 1000 - 1025 - 1035 - 1055 - 1085 - 1135 - 1220 - 1240 - 1260 - 1280 - 1330 - 1370 - 1440 - 1450 - 1530 - 1615 - 1685 - 1710 - 2500 - 2600 - 2850 - 2940 - 3080 - 3300 - 3350 -

13) Cadavérine - 2 HCl (dans KBr)

740 - 820 - 920 - 975 - 990 - 1110 - 1165 - 1300 - 1390 - 1465 - 1550 - 1610 - 2000 - 2980 -

14) Pipéridéine (dans CCl_4)

694 - 860 - 873 - 920 - 925 - 1020 - 1115 - 1130 - 1145 - 1170 - 1240 - 1270 - 1345 - 1370 - 1440 - 2800 - 2860 - 2940 -

SPECTRES R.M.N.

Dibenzylidène-cadavérine 1

ε acétyl-lysine 2

α acétyl-lysine 3

Benzylamine 4

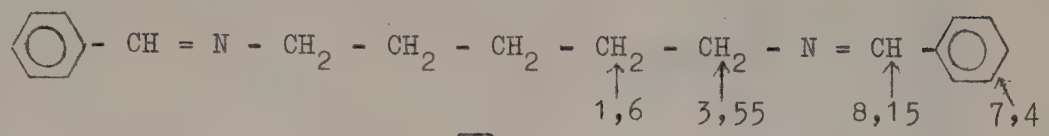
Cadavérine 5

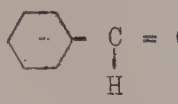
Interprétation

INTERPRETATION DES SPECTRES R.M.N.

Les chiffres indiquent les ppm.

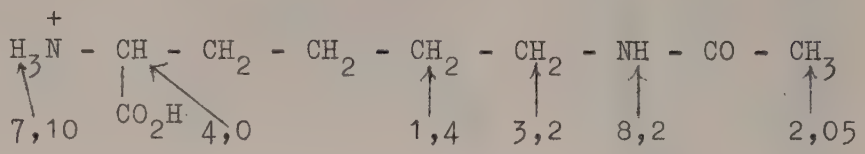
1) Dibenzylidène-cadavérine (dans $CDCl_3$)



Le pic à 10 ppm est dû à des traces de 

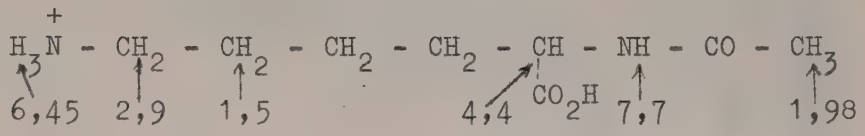
2) ε Acétyl-lysine

(dans CF_3CO_2H)



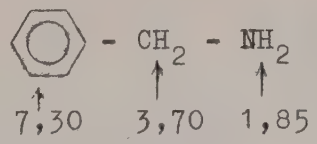
3) αacétyl-lysine

(dans CF_3CO_2H)



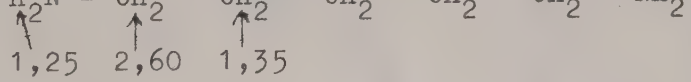
Le doublet à 7,7 ppm semble indiquer qu'il y a un couplage avec le proton du carbone en α . Il faut remarquer d'autre part que le groupe carboxylique déplace la résonance des protons de NH_3^+ vers les champs faibles et celle du proton de - NH - CO - vers les champs forts.

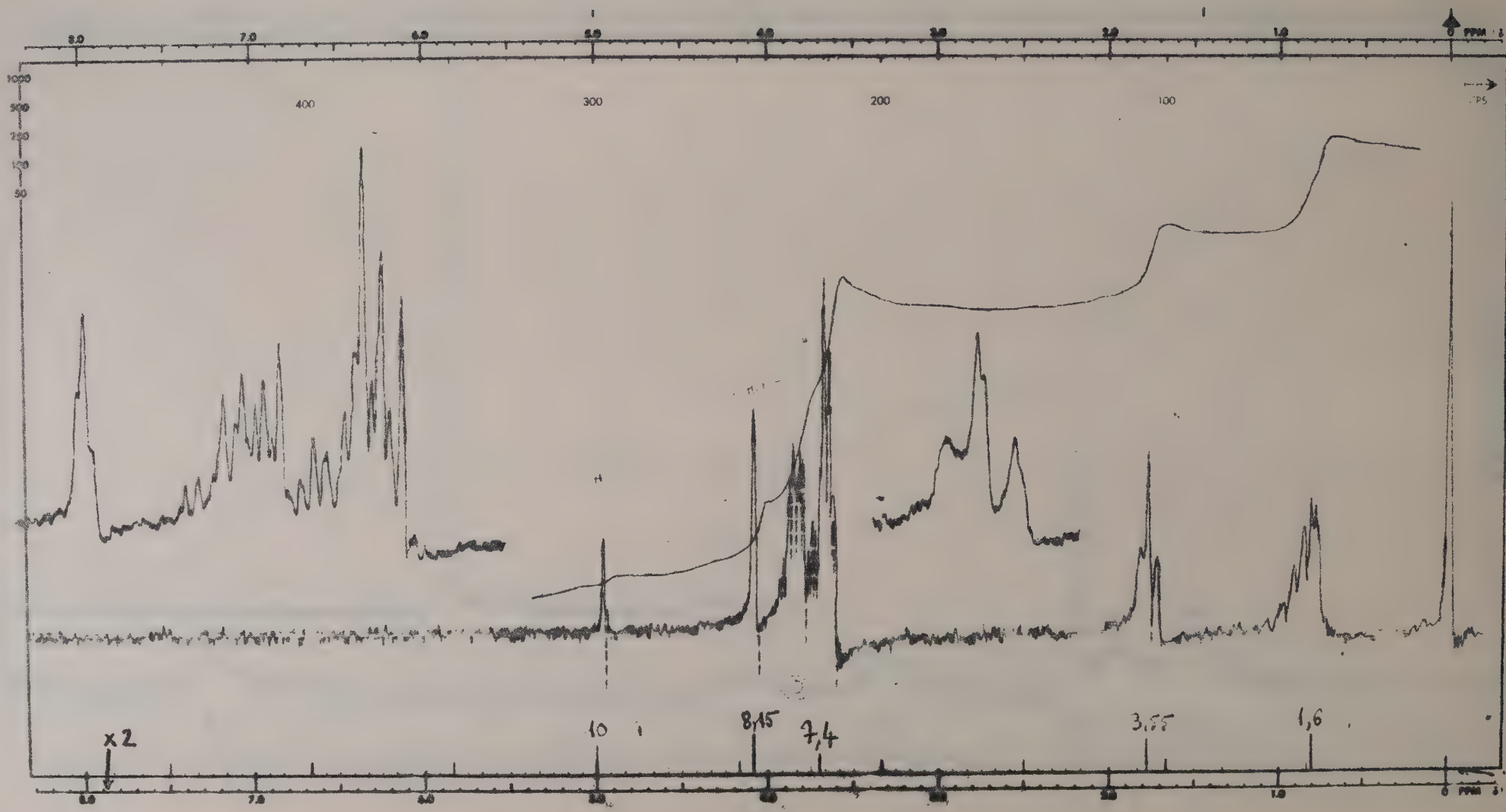
4) Benzylamine (pure)



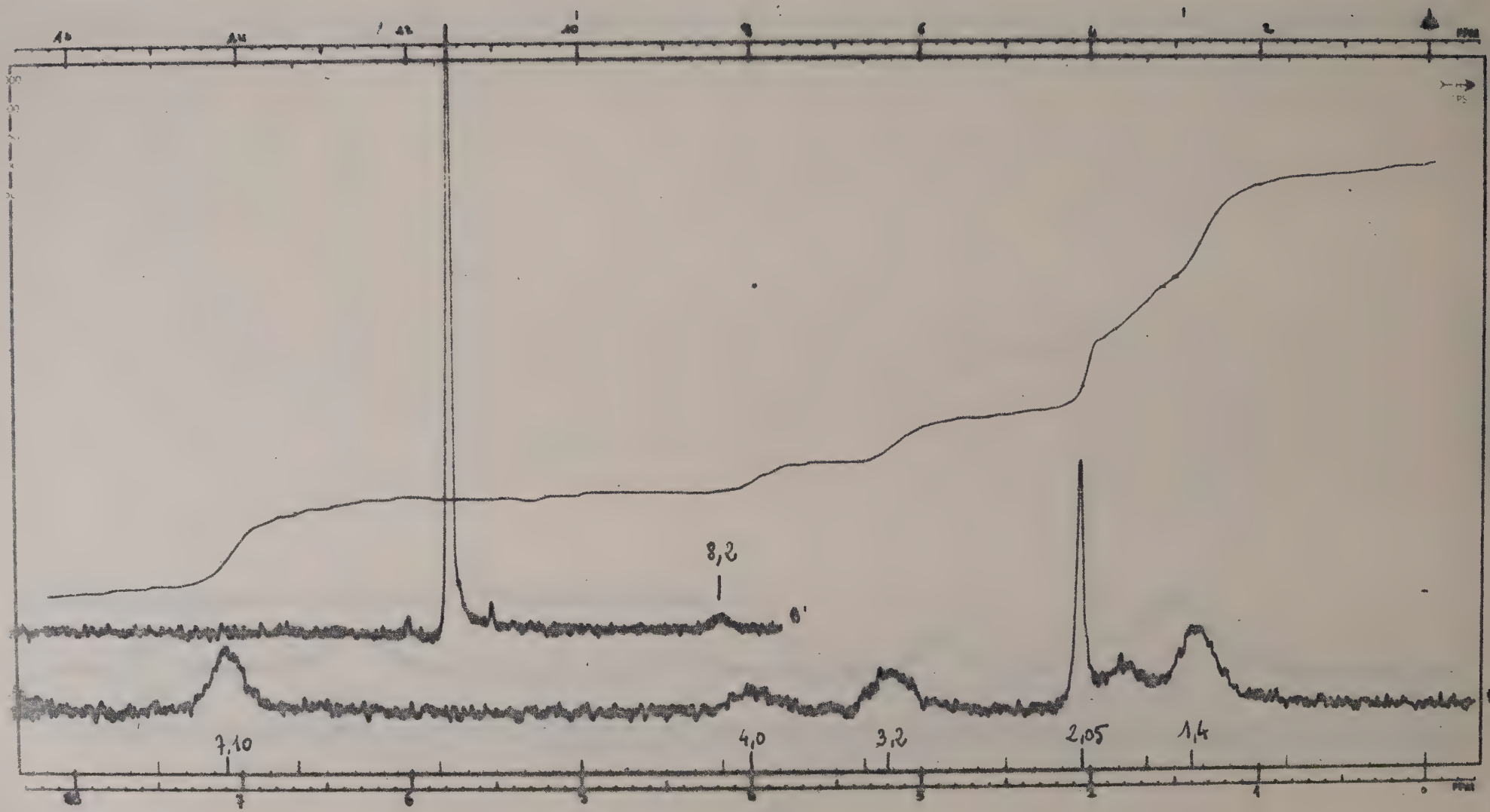
Les autres pics sont dûs à des impuretés.

5) Cadavérine (pure)

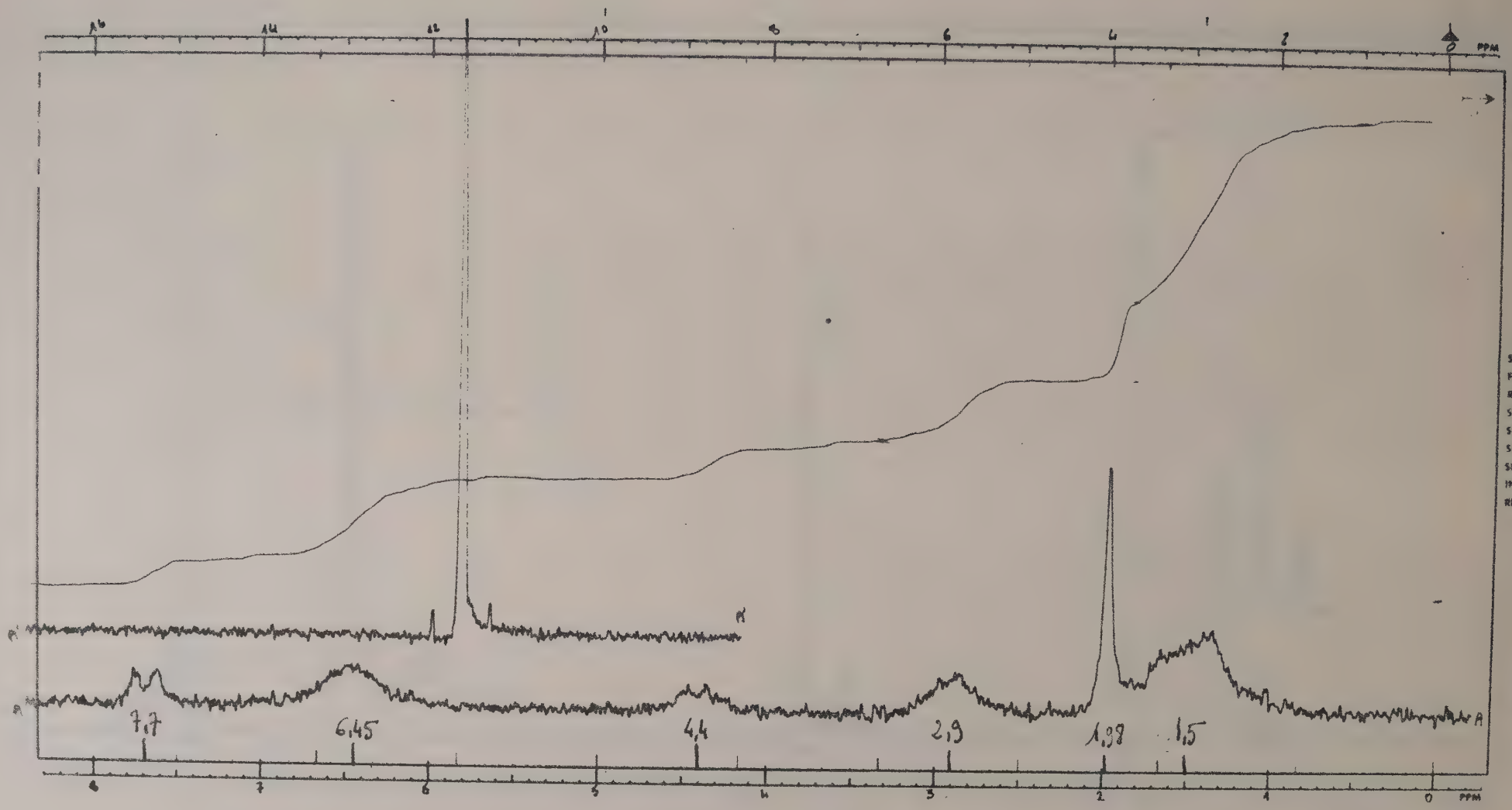



8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0 PPM
1000
500
400
300
200
100
TPS
x2
10
8,15
7,4
3,55
1,6

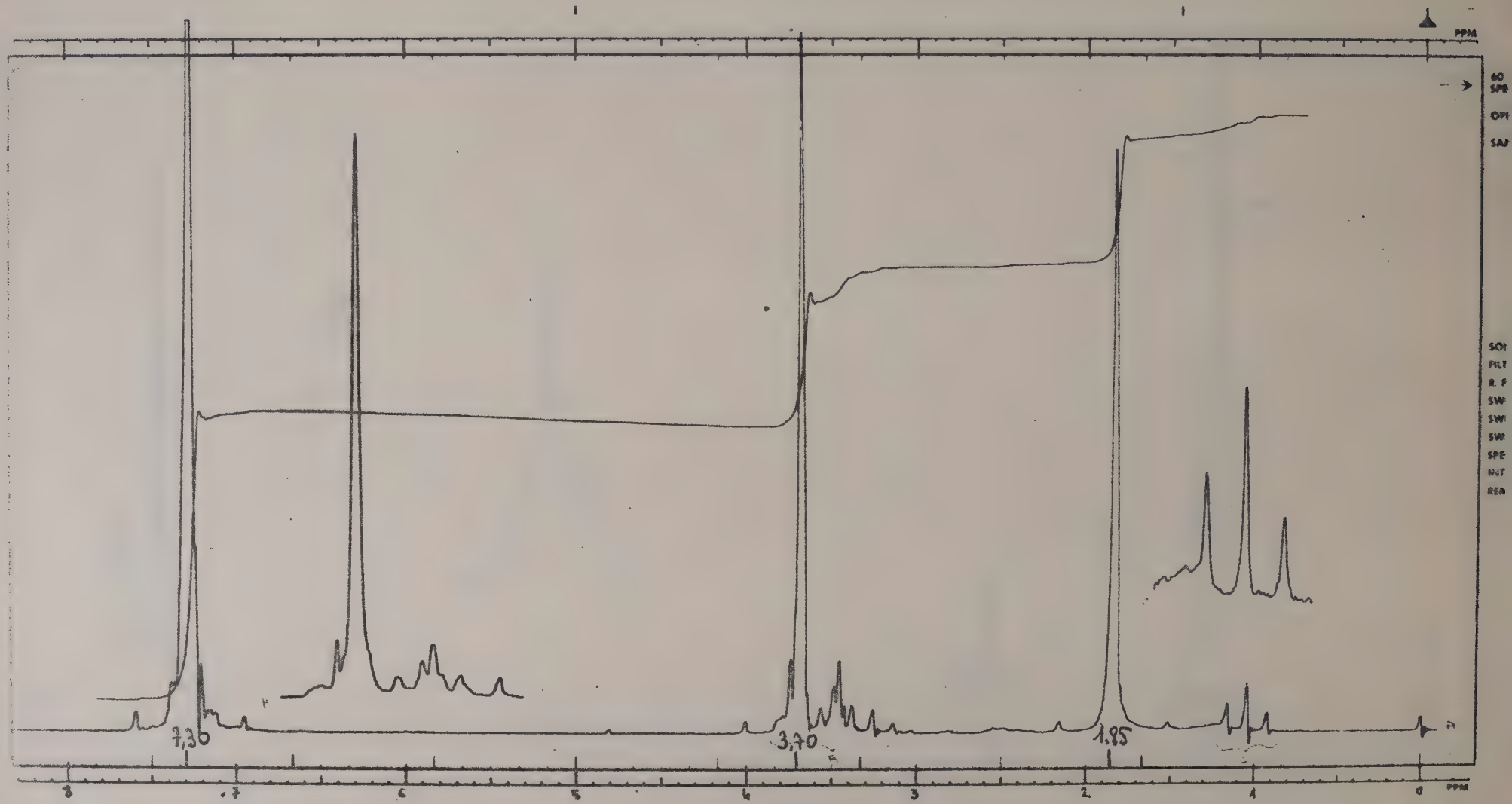
1



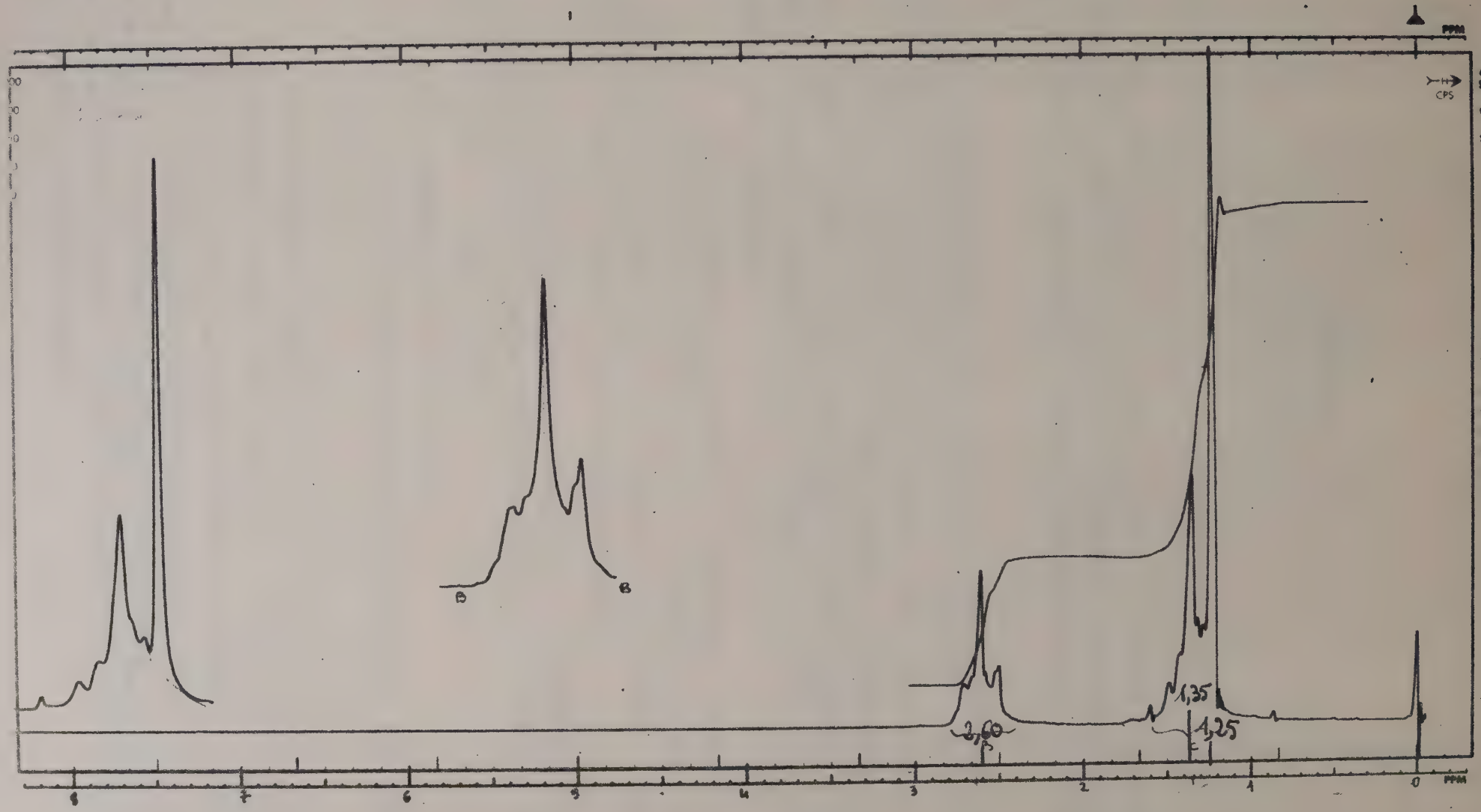
②



③



4



5

CONCLUSION

Nous nous proposions de mettre au point un procédé d'obtention de la cadavérine à partir de la lysine : les premiers résultats nous ont conduit à étudier les différents processus de décarboxylation de cet acide aminé.

En effet, la formation de la cadavérine n'est qu'un des aspects de la décarboxylation de la lysine.
Nous avons cherché à isoler les bases de SCHIFF de la lysine avec des aldéhydes et une cétone, ces bases étant seules sujettes à décarboxylation : la présence dans la lysine d'une seconde fonction amine éloignée du groupe carboxylique permet la formation de bases isolables ce qui n'est pas le cas des acides aminés simples.

Ces bases de SCHIFF se décarboxylent totalement, la réaction étant plus facile en présence d'aldéhyde libre. Il se produit donc une seconde condensation sur la fonction NH_2 en α , à partir d'une certaine température qui dépend à la fois du solvant et du composé carbonylé.

Les décarboxylations faites en utilisant le benzaldéhyde, choisi comme substance carbonylée témoin, donnent naissance, si la base de SCHIFF est utilisée seule, à trois composés :

- la cadavérine, que l'on attendait
- la benzylamine, formée à partir du benzaldéhyde, par transamination.
- la pipéridéine, produit d'une condensation interne de l' εamino-pentanal, lui-même formé à partir de la lysine par transamination.

Si l'on décarboxyle la base de SCHIFF en présence de benzaldéhyde, les produits de réaction sont différents. En plus de la cadavérine et de la benzylamine que l'on retrouve, il se forme en particulier une diphényl 1,2 éthanol-amine par une réaction d'hydroxy-alcoylation déjà signalée lors des décarboxylations des acides aminés.

Si l'on remplace le benzaldéhyde par l'anisaldéhyde, le salicylaldéhyde, le p-nitrobenzaldéhyde ou l'acétophénone, on observe une grande variété de produits de réaction dont la séparation et l'identification sont difficiles. Dans notre optique, il importait surtout d'étudier le rendement en cadavérine que permet chaque agent de décarboxylation. Nous avons alors observé que ce rendement variait de 0 pour le p-nitro-benzaldéhyde à près de 100 % pour l'acétophénone.

Toutefois, seul le benzaldéhyde permet la distillation directe de la cadavérine à partir du mélange réactionnel et donne naissance à la pipéridéine.

Nous avons terminé par une tentative de mise au point de la préparation de la cadavérine par décarboxylation de la lysine en présence d'acétophénone, donnant un rendement global de 25 %.

Ce travail a ainsi permis, d'une part, d'approcher les mécansimes de décarboxylation et transamination de la lysine et, d'autre part, de préciser les conditions théoriques les plus favorables à la formation de la cadavérine.

BIBLIOGRAPHIE

(1) BROWN, B.R., Q. Rev. Chem. Soc. 1951, 5, 131

(2) PEDERSEN, K.J., J. phys. Chem. Ithaca, 1934, 38, 559

(3) BROWN, B.R.et HAMMICK, D. J. Chem. Soc., 1949,659

(4) SCHENKEL, H. et SCHENKEL-RUDIN, M., Helv. chim. Acta, 1948, 31, 514

(5) PEDERSEN, K.J., J. Am. Chem. Soc., 1938, 60, 595

(6) BROWN, B.R., J. Chem. Soc., 1950, 778

(7) KANAO, S. et SHINOZUKA, K., J. Pharm. Soc. Japan, 1947, 67, 218 et 243

(8) BADDAR, F.G. et ISKANDAR, Z., J. Chem. Soc., 1950, 136
1954, 203 et 209
1956, 4293
, Nature, 1951, 167, 1069

(9) INGOLD, C.K., DE SALAS, et WILSON C.L., J. Chem. Soc., 1936, 1328

(10) CURTIUS, T.H., et LEDERER G., Ber., 1886, 19, 2462

(11) ERLENMEYER Jr., Ann. der Chemie, 1889, 307, 70
, 1904, 337, 210

(12) HERBST R., J. Am. Chem. Soc., 1936, 58, 2239
, Advances in Enzymology, 1946, 4, 76

(13) DOSE K., Ber., 1957, 90, 1251

(14) CHATELUS G., Thèse de Doctorat d'Etat, Clermont-Fd, 1962
, Bull. Soc. Chim., 1964, 2524

(15) AL-SAYYAB, A.F., et LAWSON, A., J. Chem. Soc., C, 1968, 406 et 411

(16) BERGMAN, M. et ZERVAS, L. Z. physiol. Chem., 1926, 152, 282

(17) HAMMICK, D.L. et coll. J. Chem. Soc., 1953, 3825, (mémoire VII)

(18) AKABORI, S., et MOMOTANI, K., J. Chem. Soc. Japan, 1943, 64, 608

(19) EMOTO, S. et ANDO, M. J. Agr., Chem. Soc. Japan, 1961, 35, 667 et 957, 962, 1027

(20) METZLER, D.E., IKAWA, M., et SNELL, E.E., J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 648

(21) DRECHSEL, E., J. prakt. Chem., 1889, 39, 425

(22) GREENSTEIN, J.P. et WINITZ, M., Chemistry of the amino acids (John Wiley et Sons), 1961, 3, 2105

(23) CARLO ERBA Sté, Brevet Italien n° 632.743 (1962) (Cf. C.A., 1963, 58, 8040f)

(24) CASIDA, U.S. Patent 2.771.396 (1956)

(25) EDSALL, J.T., et BLANCHARD, M.H., J. Am. Chem. Soc., 1933, 35, 2337
et GREEN, R.W. et TONG, H.K., J. Am. Chem. Soc. 1956, 78, 4896
(26) TAURINS, A., Can. J. RESEARCH, B, 1950, 28, 762
(27) KURTZ, A.C., J. Biol. Chem. 1941, 140, 705
(28) WREDE, F., Z. Physiol. Chem., 1931, 203, 162
(29) WITKOP, B. et BEILER, T., J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 5589
(30) PFEIFFER, P., OFFERMAN, W. et WERNER, H., J. prakt. Chem., 1942, 159, 313
(31) GALE, E.F., Advances in Enzymology, 1946, 6, 1
Biochem. J., 1945, 39, 46
(32) ROTHSTEIN, M., et MILLER, L., J. Biol. Chem.1954, 211 , 851
(33) PUTOCHIN, N., C.A. 1929, 2938 et Trans. Inst. Pure Chem. Reag. 1927, 6, 10
(34) CLARKE, D.D., et coll. Arch. Biochem. Biophys. 1959, 79, 338
(35) CAGLIOTI, V. et FURLANI, C. Gaz. Chim. Ital., 1962, 92, 1276
(36) BIEMANN, K., Mass Spectrometry, 1962, 265
(37) HOUBEN-WEYL, Methoden der organischen Chemie, 5e édit. 14/2, 135
(38) HASEGAWA, M. et coll., Kogyo Kagaku Zasshi, 1962, 65, 661
(39) ZUMAN, P., Chemicke Listy, 1952, 46, 688
(40) SMITH, P., Organic chemistry of open chain nitrogen compounds, 1965,
Chap. 7, 301
(41) CRIVELLO, J., KUROSAKI, T.,et D'ALELIO, G.F., Sci. Techn. Aerospace Rept.,
1966, 3(2), 179
(42) SCHOPF, G., KOMSAK, A., BRAUN, F. et JACOBI, E., Ann. der Chemie, 1947, 559, 1
(43) MEISTER, A., J. Biol. Chem., 1954, 206, 577
(44) TAKAGI, E., J. Pharm. Soc. Japan. 1951, 71, 648 (Cf.C.A., 1952, 8046 b)

DEUXIEME THESE

"Développements récents de la chromatographie en phase liquide"

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

(Décret n° 67-750 du 29 Août 1967)

Clermont-Fd, le 17 Juin 1968

Le Doyen,

J. SAUREL

Imprimerie : Faculté des Sciences- Clermont-Ferrand
Dépôt légal 3ème trimestre 1968